N° D'ORDRE :
19

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Suzanne LAFOURCADE

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTIVEURS ET DES INHIBITEURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DES MOÛTS DE RAISIN

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le , *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS — *Président.*
DAVID, RIBÉREAU-GAYON — *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, Rue Keppler, Paris-16e

1954

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543913_0006

N° D'ORDRE :
19

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Suzanne LAFOURCADE

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTIVEURS ET DES INHIBITEURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DES MOÛTS DE RAISIN

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le , *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS — *Président.*
DAVID, RIBÉREAU-GAYON — *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, Rue Keppler, Paris-16e

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

	MM.	
Doyen	BRUS	
Doyens honoraires	PADE	Recteur honoraire de l'Acad. d'Aix
	PICART	Membre de l'Institut
	DUPONT	Directeur de l'École Normale Sup.
	CHAINE	
	MERCIER	
Professeurs honoraires	PADE	Recteur honoraire de l'Acad. d'Aix
	BOUNHIOL	
	DEVAUX	Membre de l'Institut
	DUPONT	Directeur de l'École Normale Sup.
	PICART	Membre de l'Institut
	DAURE	Recteur de l'Académie de Caen
	CHAINE	
	KASTLER	Professeur à la Sorbonne
	QUELET	Professeur à la Sorbonne
Professeurs	MERCIER	Radioélectricité
	MILLOUX	Calcul infinitésimal
	DANGEARD	Botanique
	GENEVOIS	Chimie biologique et Physiologie végétale
	CAU	Physique expérimentale
	BRUS	Chimie
	AVEL	Zoologie et Physiologie animale
	ROUSSET	Physique générale
	ROGER	Mécanique rationnelle
	WEILL	Anatomie comparée et Embryogénie
	SERVANT	Physique
	DUFRESNOY	Mathématiques générales
	LAFON	Physiologie générale
	DAVID	Biologie végétale
	PISOT	Calcul des probabilités
	BOUNHIOL	Biologie animale
	SCHOELLER	Géologie
	GAY	Minéralogie
	CALAS	Chimie organique
	GUIZONNIER	Physique
	ALLARD	Chimie
	LAMARE	Géologie
	PATY	Chimie
	COLMEZ	Mathématiques
	PACAULT	Chimie physique
	Mlle JOSIEN	Chimie minérale
	RIBÉREAU-GAYON	Œnologie et chimie agricole
	CAMBAR	Biologie générale
	MALVESIN-FABRE.	Botanique
	VIGNEAUX	Géologie
Maître de conférences honoraire	de PUYMALY	
Secrétaire principal	ARTIGUELONG	

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MES PARENTS

Monsieur JEAN RIBÉREAU-GAYON

Professeur d'Œnologie et Chimie agricole à la Faculté des Sciences de Bordeaux,
Directeur de la Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux,

a inspiré et dirigé ce travail. Il n'a cessé d'être pour nous un Maître bienveillant qui a patiemment veillé à notre formation et dont le riche enseignement et l'exemple nous ont donné le goût de la recherche.

Nous le prions de trouver ici un modeste hommage de notre vive admiration et de notre profonde et sincère gratitude.

Monsieur E. PEYNAUD

Ingénieur-Docteur
Chargé de Recherches à la Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux,

nous a guidée pas à pas très amicalement. Ses conseils éclairés, ses critiques pénétrantes, son aide constante, nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous l'assurons de nos sentiments les plus reconnaissants.

Monsieur L. GENEVOIS

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Bordeaux,

nous a fait l'honneur de s'intéresser à ce travail et de présider le jury de cette thèse.
Nous lui exprimons notre respectueuse admiration.

Nous remercions vivement :

le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux,

l'Institut Technique du Vin,

le Centre National de la Recherche Scientifique

dont l'aide matérielle nous a permis d'effectuer ces recherches dans les laboratoires de la Station Œnologique.

Nous tenons à remercier aussi :

l'Institut National de la Recherche Agronomique

qui a bien voulu accueillir notre travail dans ses Annales, et par là nous permettre d'imprimer cette thèse.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTIVEURS ET DES INHIBITEURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DES MOÛTS DE RAISIN

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTIVEURS ET DES INHIBITEURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DES MOÛTS DE RAISIN

PAR

M^lle S. LAFOURCADE

Ingénieur Docteur

INTRODUCTION

La fermentation alcoolique du moût de raisin est un phénomène singulièrement complexe. Nous sommes loin de connaître exactement l'incidence sur son déroulement de toutes les conditions extérieures et de la composition du milieu. Il existe beaucoup de faits inconnus. Les résultats apportés par l'étude de la fermentation au laboratoire trouvent des applications immédiates dans la pratique de la vinification. Certes, les procédés empiriques mis en œuvre par les praticiens permettent l'obtention de vins de grande qualité et d'excellente tenue. Mais parfois aussi, ces mêmes techniques sont impuissantes devant les multiples « accidents » de fermentation ou de refermentation. Il semble que beaucoup de ces difficultés pourraient être évitées, si on savait à coup sûr, pour un jus de raisin donné, accélérer ou arrêter à volonté sa fermentation.

Le problème est difficile : le jus de raisin est pour les levures un milieu nutritif en général très riche, mais de composition très variable suivant le cépage, l'année, la région, les modalités de préparation. On ne connaît pas d'ailleurs avec précision les teneurs en les divers facteurs de croissance des moûts de raisin. Le remède à une insuffisante activité des levures dans un moût ne consiste pas, forcément, à ajouter à celui-ci de fortes quantités de phosphate d'ammoniaque, selon la thérapeutique autorisée, car il peut être suffisamment pourvu en azote ammoniacal, ou à le soumettre à une aération qui n'est efficace qu'autant que les levures trouvent dans le milieu les facteurs nutritifs nécessaires.

D'autre part, arrêter les levures en pleine activité dans leur milieu de prédilection, et stabiliser définitivement ce dernier, pose un problème encore plus délicat : la levure est une cellule particulièrement résistante, supportant aisément des écarts de pH de 2,5 à 8,5, des concentrations en alcool de 12, 15 et même 18 p. 100 en volume. C'est une des cellules qui paraît être la mieux armée contre les antiseptiques. L'acide sulfureux,

à forte dose, parvient à l'inhiber, mais d'une manière nullement irréversible ; encore connaît-on les inconvénients et les abus qu'entraîne son emploi.

Nous avons cherché à reconsidérer ces problèmes en leur apportant les données des connaissances récentes de la biochimie et une expérimentation méthodique.

Dans le premier chapitre, nous décrivons les milieux de culture et les techniques utilisés au cours du présent travail.

Notre exposé se divise ensuite en deux parties.

Dans la première partie, nous cherchons à préciser le mode d'action de certains facteurs connus pour leurs propriétés activantes sur la croissance des levures et la vitesse de la fermentation : l'aération, surtout dans le but de préciser le moment où elle doit être effectuée (chapitre II) ; la nutrition azotée (chapitre III) ; les vitamines, après une étude des besoins en facteurs de croissance de quelques levures types isolées des moûts du Bordelais (chapitre IV) ; enfin certains produits d'origine fongique, étude qui met en évidence leur supériorité en tant qu'activeurs (chapitre V).

Dans la deuxième partie, après un rappel des conditions rationnelles de l'emploi de l'acide sulfureux en vinification, et des effets d'autres substances antiseptiques connues, nous cherchons un produit de substitution ou de renforcement de l'acide sulfureux parmi les antiseptiques nouveaux, tels les sels d'ammonium quaternaire, certains produits fongicides de synthèse (chapitre VI) et les antibiotiques antifongiques (chapitre VII). Ces derniers ont particulièrement retenu notre attention par la puissance inhibitrice et la spécificité de certains d'entre eux vis-à-vis de levures bien déterminées.

Nous exposons enfin dans le chapitre VIII, les recherches poursuivies sur la fermentation des moûts botrytisés, qui nous ont amenés à conclure à la formation par le *Botrytis cinerea* d'une substance antilevure, la botryticine.

CHAPITRE PREMIER

MILIEUX, MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

Pour connaître l'action sur la fermentation alcoolique du moût de raisin d'un facteur activant ou inhibiteur, on compare la marche de la fermentation en sa présence à celle d'une fermentation témoin se déroulant dans les mêmes conditions expérimentales, mais en l'absence de ce facteur. Diverses mesures sont nécessaires pour saisir l'ensemble du phénomène. Il importe autant en effet, de connaître la multiplication des levures et leur comportement dans le milieu que la vitesse de la transformation du sucre.

Nous traiterons successivement des conditions expérimentales, milieux et matériel que nous avons été amenés à adopter et des techniques utilisées pour suivre les divers phénomènes fermentatifs. Nous exposerons, dans le chapitre qui leur est réservé, les méthodes appliquées à l'étude des besoins en facteurs de croissance des levures.

I. — Milieux de fermentation

Nos essais tendant à des fins pratiques, nous avons le plus souvent possible choisi pour milieu d'expérience, un jus de raisin naturel prélevé au moment de la vendange dans le vignoble girondin. C'est, par exemple, un moût de raisins rouges légèrement coloré, titrant 200 g de sucre par litre, et conservé en bouteilles après une pasteurisation à 80° effectuée le jour même de la récolte. Très riche en aliments azotés et en vitamines, il permet, à l'état original, une fermentation alcoolique rapide et une bonne croissance des levures. D'autres essais ont été effectués avec des moûts de raisins blancs, ayant jusqu'à 235 g de sucre.

Nous avons étudié dans ces milieux l'influence des inhibiteurs et celle des activeurs, nous mettant ainsi volontairement, dans les conditions les plus défavorables à leur action.

Pour obtenir des arrêts de fermentation, nous avons enrichi ces moûts en sucre, soit par addition de saccharose soit en leur mélangeant un muté de 15° Baumé, désulfité au préalable par entraînement à la vapeur d'eau. Le milieu ainsi constitué est beaucoup moins fermentescible que le moût naturel.

Le milieu à base d'eau de levure convient généralement moins bien à la fermentation alcoolique qu'un milieu naturel. La production des levures y est beaucoup plus faible que dans le jus de raisin et la vitesse de fermentation moins rapide. On prépare ce milieu en mélangeant 200 g de levure de boulangerie à 1 litre d'eau. On autoclave 15 minutes à 120°C. On filtre à chaud à travers un papier épais plissé ou de la pâte à papier,

jusqu'à l'obtention d'une liqueur limpide. On ajoute alors le sucre et on enrichit le milieu en sulfate d'ammonium. On dilue enfin pour obtenir un milieu contenant 5 à 10 p. 100 d'eau de levure. A des concentrations plus fortes, le bouillon de levure gêne la fermentation.

Enfin, dans certains cas, nous avons expérimenté avec un milieu entièrement synthétique de composition suivante :

Saccharose pur	100 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Asparagine cristallisée	2 g
Phosphate acide de potassium	2 g
Acide citrique	6 g
Cendres de levure de boulangerie	2 g

Ces produits sont dissous dans la quantité d'eau bidistillée suffisante.

On amène à pH 3,5 par addition de potasse concentrée. La présence d'acide citrique tamponne le milieu. On filtre ; on ajoute les facteurs de croissance suivants :

Biotine	20 γ
Mésoinositol	10 mg
Thiamine, pyridoxine, acide nicotinique, acide pantothénique, acide p.aminobenzoïque, chacun	0,2 mg

On complète à un litre avec de l'eau bidistillée.

II. — Levures utilisées

La fermentation de ces divers milieux stérilisés est toujours provoquée par un ensemencement très faible, à l'aide de quelques gouttes d'un levain âgé de 2 à 3 jours d'une souche pure de levures.

L'importance de la valeur de l'ensemencement sur la vitesse et la durée de la fermentation est bien connue. Des essais ont montré qu'une fermentation s'amorce, par exemple, après 5 jours d'incubation et dure 8 jours avec un ensemencement de l'ordre de 1 à 25 levures par mm^3 ; mais elle commence pratiquement sur le champ et dure seulement 3 jours, si on ensemence avec 200 000 levures par mm^3. Mais quelle que soit la concentration levurienne au départ, dans d'assez larges limites, le nombre des levures en fin de fermentation et leur poids sont sensiblement les mêmes, pour un jus de raisin donné et dans des conditions expérimentales déterminées. Dans nos essais, les fermentations sont toujours soumises, en effet, à un facteur limitant, oxygène ou élément nutritif.

L'ensemencement, tel que nous l'effectuons généralement, avec une centaine de levures par mm^3, provoque une période de latence de 24 heures environ. D'autre part, les variations de population totale et de vitesse de fermentation, dues au facteur en étude, sont toujours appréciées par rapport à un témoin.

Nous avons eu à notre disposition, dans cette étude, les levures de la collection de la Station Œnologique. Les souches qui la composent au nombre de plusieurs centaines, proviennent des prélèvements effectués dans les diverses régions vinicoles de la Gironde au moment des vendanges (1). Les différents genres et espèces de levures ayant un intérêt œnologique y sont représentés. D'autre part, certaines levures nous ont été fournies par l'Institut de Microbiologie de Pérouse (Professeur T. Castelli).

Les caractères de ces levures nous sont connus exactement par les travaux d'identification qui ont servi à leur classification, et par les analyses détaillées des milieux après fermentation. Elles sont conservées par repiquages fréquents, croisés en milieux solide et liquide.

Nos essais ont surtout été conduits avec deux *Saccharomyces ellipsoïdeus*, la souche n° 41 provenant d'un moût de Sauternes et la souche n° 51 prélevée à Saint-Emilion, choisies pour leur pouvoir fermentatif moyen.

III. — Température d'incubation

Des essais de fermentation conduits à des températures comprises entre 20 et 35°C ont montré que pour les Saccharomyces les températures optima de fermentation se situent entre 25 et 30°C. A température plus élevée la croissance des levures est augmentée et la vitesse de fermentation est plus grande dans les premiers jours d'incubation, mais elle s'arrête très vite, laissant du sucre non fermenté dans le milieu. A la température de 20°C, la vitesse de fermentation est très lente, mais de plus grandes proportions de sucre sont transformées. D'autre part, les variations de température pendant la fermentation peuvent en modifier profondément le cours : en règle générale, la fermentation est toujours plus rapide et plus complète lorsque la température à laquelle elle se déroule , est maintenue constante (2).

En conséquence, sauf pour les essais où précisément le facteur température était étudié, nous avons choisi la température constante de 25°C pour notre étude.

IV. — Conditions d'aération

Les fermentations aérobies sont conduites dans des flacons incomplètement pleins, simplement bouchés d'un tampon d'ouate. L'inconvénient est qu'on ne connaît pas exactement la quantité d'air ainsi introduite et que l'évaporation est importante.

Les conditions d'anaérobiose sont obtenues par un dispositif très simple, remplaçant le barboteur classique et évitant toute entrée d'air.

Il est constitué par un bouchon de liège paraffiné ou de caoutchouc, percé d'un trou dans lequel est adapté un tube de verre très effilé et rempli d'ouate. Le dégagement continu du gaz carbonique et la ténuité des surfaces d'échange dans l'effilure interdisent toute pénétration d'air au cours de la fermentation.

Les flacons obturés de ces deux manières peuvent représenter, à l'échelle du laboratoire, les cuves ouvertes et les cuves fermées qu'on rencontre dans la pratique des cuviers. Sans doute, bien des facteurs de la vinification en cuves de 100 hl et 200 hl échappent à l'expérimentation en flacons de 100 cm^3 à 750 cm^3. Mais les faits observés au laboratoire ont pu être confirmés dans des essais reproduits sur de gros volumes. Cependant on doit considérer que l'expérimentation au laboratoire réalise des conditions extrêmes. L'anaérobiose y est plus poussée que dans la pratique, les aérations y sont également plus fortes. On devra en tenir compte dans l'extrapolation des résultats aux conditions de la pratique.

V. — Détermination de l'évolution de la fermentation

Différents procédés peuvent être employés pour déterminer la marche de la fermentation. Nous en avons utilisé deux, choisis pour leur rapidité et la précision satisfaisante de leurs résultats ; dosage des sucres réducteurs contenus dans le milieu et pesées du gaz carbonique dégagé par la fermentation.

a) **Dosage des sucres réducteurs.** — Ce dosage est effectué avec la liqueur de Fehling, après dilution convenable et décoloration par la quantité de charbon activé juste nécessaire.

La technique s'applique au cas de fermentations pour lesquelles on dispose d'un volume suffisant ; elle est précise, mais elle oblige à ouvrir les flacons d'expérience en prenant les précautions nécessaires pour éviter les contaminations, et à faire des prélèvements de liquide qui risquent finalement de modifier les conditions de fermentation.

b) **Pesées du gaz carbonique dégagé.** — Le procédé consiste simplement à peser au milligramme près les flacons d'expérience à intervalles déterminés. La perte de poids observée est due au gaz carbonique dégagé et aussi à une légère évaporation du liquide. Il n'est possible de suivre de cette façon que des fermentations anaérobies. Le dispositif d'obturation par tubes effilés diminue l'évaporation au minimum. Nous joignons, du reste, à la série des flacons en essai, un flacon contenant le même milieu non ensemencé et soumis aux mêmes conditions expérimentales ; sa perte de poids chiffre la valeur moyenne de l'évaporation dans chaque flacon. La perte par évaporation atteint à peine 1 p. 100 du poids du gaz carbo-

nique dégagé. La technique ne peut s'appliquer qu'à des essais effectués sur de petits volumes, flacons contenant 50 cm³ de moût, ou encore tubes à essai contenant 10 à 15 cm³ de liquide.

Du poids de gaz carbonique dégagé, on peut calculer approximativement, si on le désire, le poids de sucre fermenté par litre. D'après PASTEUR, le sucre donne en fermentant 46 p. 100 de son poids de gaz carbonique. On fera le calcul de la façon suivante :

$$\text{Sucre fermenté par litre} = \frac{(\text{Perte de poids} - \text{perte par évaporation}) \times 100}{46}$$

Ces résultats sont bien entendu approximatifs, mais ils ont une valeur comparative. Cette technique a l'inconvénient d'être limitée aux conditions d'anaérobiose et d'interdire un prélèvement dans les flacons en cours d'expérience. Elle ne permet pas de suivre la croissance des levures. Par contre elle permet d'aller très vite en utilisant la balance Mettler à un seul plateau. Il est alors possible d'envisager l'étude simultanée d'un grand nombre de facteurs, ce qui ne pourrait pas être réalisé par dosage chimique des sucres.

Parfois les cas intéressants signalés par ce procédé ont été repris et suivis par un dosage précis des sucres en vue d'une étude plus approfondie.

VI. — Mesure de la croissance des levures

On dispose de plusieurs techniques pour évaluer la population des levures d'un milieu (3). Par néphélométrie, c'est-à-dire en mesurant dans des conditions précises l'absorption lumineuse par une culture sous une certaine épaisseur, on obtient des données dont la précision peut être suffisante. On sait qu'il existe en effet, entre certaines limites, un rapport entre l'intensité du trouble et le poids ou le nombre des cellules en suspension. Mais certains phénomènes fermentaires exigent pour leur interprétation la connaissance du nombre des levures vivantes et capables de se multiplier, à côté de leur nombre total dans le milieu. L'hématimètre permet de compter la totalité des levures, mais ne nous renseigne pas sur leur état. Les cellules vivantes pourraient être décelées par la coloration directe des préparations au moyen des colorants basiques. Ces colorants pénètrent seulement dans les cellules mortes. Toutefois, ces méthodes de coloration sont délicates et leurs résultats souvent douteux. Nous leur avons préféré la numération des colonies formées en milieu nutritif solide.

a) **Numération des cellules totales à l'hématimètre**. — Le compte-globules de Malassez, d'un usage courant en hématologie, est une chambre graduée, enchâssée dans une plaque métallique. L'épaisseur du liquide est réglée à 1/5 de mm par trois vis faisant saillie, sur lesquelles vient

s'appuyer la lamelle. Le quadrillage visible au microscope est formé de rectangles eux-mêmes composés de 20 petits carrés. Chaque rectangle correspond à 1/100 de mm³.

Pour faciliter le dénombrement des cellules, l'échantillon à observer est dilué de façon à ramener le nombre de levures à une cinquantaine dans chaque rectangle. C'est au voisinage de cette concentration que la numération a le plus de chance d'être exacte. On est ainsi amené à faire des dilutions au cinquième dans les premiers jours de la fermentation, au dixième en fin de fermentation ou au vingtième pour les fermentations aérobies.

Le prélèvement de l'échantillon s'effectue aseptiquement après avoir longuement agité le liquide pour mettre ses levures en suspension. On dilue et on agite à nouveau. On laisse tomber d'une pipette les deux premières gouttes de cette préparation à l'extérieur, puis les deux suivantes dans la chambre graduée du compte-globules, sans la toucher avec la pointe de la pipette. Il faut opérer rapidement, sinon les levures tendent à s'accumuler à l'extrémité inférieure de la pipette et la numération serait faussée par excès. On rabat le compresseur sur lequel on a fixé la lamelle en le mouillant légèrement.

On place le compte-globules sur le chariot d'un microscope. Un grossissement de 300 à 400 permet d'avoir un rectangle entier de la chambre graduée dans le champ de l'objectif et une bonne visibilité des cellules. On déplace le chariot rapidement pour examiner la distribution des cellules dans la chambre entière et vérifier qu'on n'a pas introduit de bulles d'air. Les levures se déposent très vite. Si elles paraissent également réparties, on les compte dans 4 ou 5 rectangles. On retient la moyenne de ces numérations.

On obtient ainsi très rapidement et à 5 p. 100 près environ, le nombre total des levures contenues dans 1/100 de mm³ du liquide en fermentation. On exprime la population en milliers par mm³.

b) **Numération des cellules vivantes sur milieu nutritif solide.** — En milieu nutritif solide sur boîte de Pétri, seules les levures susceptibles de se reproduire formeront des colonies. Les colonies comptées correspondent donc au nombre des cellules vivantes.

On calcule approximativement les dilutions de manière à compter au maximum une cinquantaine de colonies par boîte. On réalise ces dilutions au moyen de flacons contenant 99 cm³ d'eau distillée stérile. Dans les premiers jours de la fermentation les dilutions au 1/1 000 000 sont nécessaires, puis au 1/100 000 et au 1/10 000. En fin de fermentation une dilution au 1/100 suffit le plus souvent.

On prélève un petit volume du liquide en fermentation aseptiquement et après agitation du liquide comme précédemment. Dans le cas où les

deux techniques de numération sont employées, on utilise le même échantillon. Avec des pipettes stériles graduées à 1 cm³ et 0,1 cm³, on dilue convenablement la prise d'essai, utilisant pour cela successivement un, deux ou trois flacons d'eau stérile. 1 cm³ du dernier flacon, au préalable fortement agité, est ajouté à un tube contenant 10 cm³ de moût stérile. On homogénéise l'ensemencement en roulant verticalement le tube entre les deux mains. On verse dans une boîte de Pétri stérile et on ajoute aussitôt 10 cm³ de gélatine à 20 p. 100, liquéfiée à 40°C, en évitant de trop soulever le couvercle. On mélange en faisant glisser la boîte d'un mouvement circulaire, avec précaution, sur une surface bien horizontale et on laisse refroidir. Après solidification du milieu on porte les boîtes à l'étuve à 20°C. Après 4 à 10 jours on peut compter les colonies formées.

Les dilutions successives nécessitées par cette méthode augmentent les causes d'erreur. 10 p. 100 est la précision maximum à laquelle on puisse prétendre (1).

Ces techniques de numération nous ont permis de saisir plusieurs états de la cellule de levure, avec, bien entendu, tous les intermédiaires possibles :

1° Levures en pleine activité, capables de former rapidement des colonies en milieu nutritif solide.

2° Levures vivantes, mais à l'état de vie ralentie : les colonies sur boîte de Pétri apparaissent après une longue période d'incubation.

3° Levures vivantes mais incapables de se reproduire et de donner naissance à des colonies, mais qui, sous l'effet d'une aération par exemple, peuvent à nouveau retrouver la faculté de se multiplier.

4° Enfin, levures mortes, livrées à l'autolyse.

(1) Il arrive, surtout dans la première phase de la fermentation, que le nombre des levures vivantes ainsi trouvées, dépasse légèrement le nombre des levures totales déterminées à l'hématimètre. Il est probable, en effet, que l'agitation violente dans les flacons à dilution et l'addition de gélatine chaude favorisent la séparation des cellules qui bourgeonnent.

ACTIVEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'AÉRATION

L'importance de l'aération sur la fermentation du moût de bière fut reconnue par Pasteur qui montra que l'oxygène est nécessaire à la multiplication des levures (4). L'oxygène joue un rôle encore plus important dans la vinification. Dans la pratique, la fermentation doit être rapide et complète. Dans la vinification en rouge en particulier, elle doit se terminer en 8 à 10 jours et ne pas laisser de sucre fermentescible. Ceci exige une bonne croissance des levures et le facteur activant primordial est l'oxygène.

J. Ribéreau-Gayon (5) a décrit en 1945 une expérience très simple qui met en évidence l'action de l'air au cours de la fermentation du moût de raisin. Nous l'avons reproduite au laboratoire de nombreuses fois. On fait fermenter à 25°C deux flacons contenant un même volume d'un même moût. L'un est bouché d'un tampon d'ouate, l'autre d'un bouchon percé d'un tube effilé rempli de coton. On suit la marche des fermentations et on procède journellement à la numération des cellules totales et des cellules vivantes.

La première partie du tableau I rassemble quelques uns des résultats obtenus.

En milieu aéré, tout le sucre est fermenté en 10 jours. Le maximum de la population est atteint 5 jours après l'ensemencement, avec 85 000 levures actives par mm³. Ces chiffres se retrouvent presque exactement au dixième jour de la fermentation. Les levures restent capables de se multiplier jusqu'à la complète transformation du sucre. La diminution du nombre des cellules pouvant former une colonie en milieu solide s'amorce dès que le sucre a disparu. En 5 jours, le nombre des levures vivantes passe de 60 à 4 unités par millième de mm³. Un mois après, l'autolyse a détruit 50 p. 100 du nombre total des levures, et 70 par mm³ seulement sont encore réellement actives.

La fermentation est beaucoup plus lente à l'abri de l'air et laisse 28 g de sucre non fermenté dans le milieu après un mois. Au cinquième jour de la fermentation, la population levurienne totale a atteint un plafond de 42 000 cellules par mm³. Toutes sont actives. Au huitième jour,

alors que le milieu a encore 50 g de sucre par litre, le nombre de levures relevé à l'hématimètre est identique au précédent, mais la moitié seulement de ces levures peuvent former des colonies sur milieu solide. Dès lors, la marche de la fermentation ralentit. 15 jours après l'ensemencement, le nombre des cellules vivantes est devenu très faible et la transformation du sucre reste incomplète.

En résumé, la fermentation est rapide et complète en aérobiose. Elle est beaucoup plus lente et s'arrête avant que tout le sucre ne soit transformé en anaérobiose. Les conditions d'aérobiose agissent aussi sur la croissance des levures : non seulement elles doublent leur nombre, mais encore elles prolongent leur période de vie active. En réalité, la phase de multiplication logarithmique des cellules dans un moût en fermentation est relativement courte. Elle est suivie, aussitôt, d'une phase de diminution du nombre des levures capables de former des colonies en milieu solide, et cette phase paraît être aussi rapide que la phase de pleine croissance. En milieu aéré, l' « inanition » des cellules ne commence que lorsque tout le sucre est fermenté. En l'absence d'air le phénomène s'amorce au moment où le milieu contient encore de fortes quantités de sucre, et on conçoit que la fermentation s'arrête avant l'épuisement total du sucre.

I. — Influence de l'aération en cours de fermentation

Dans la vinification en cuve de grande capacité, telle qu'on la pratique pour les vins rouges de Bordeaux, pour éviter les arrêts de fermentation, on procède à des remontages. Le remontage consiste en une aération effectuée en faisant couler le vin en fermentation de la cuve dans un récipient, d'où le liquide est repompé dans le haut de la cuve. Cette pratique déjà courante au XVIII^e^ siècle selon LABORDE (6), généralisée par GAYON (7) dans le Bordelais après 1893, est souvent utilisée de manière empirique. Nous avons montré que pour être vraiment efficace le remontage doit s'effectuer dans les tout premiers jours de la fermentation (8). Voici une nouvelle expérience qui le démontre d'une manière encore plus formelle.

On fait fermenter à 25°C une série de flacons contenant un moût de 13° Baumé. L'un d'eux est obturé par un tampon d'ouate, et les quatre autres par des bouchons percés de tubes effilés. L'un de ces derniers fermentera continuellement à l'abri complet de l'air ; le liquide de chacun des trois autres est saturé d'oxygène, respectivement les deuxième, quatrième et huitième jours après l'ensemencement. Pour cela, on agite pendant 3 minutes le liquide dans une fois son volume d'air. Dans ces conditions, la dissolution de l'oxygène peut être estimée à 6 cm³ environ par litre. On suit la marche des fermentations par dosage du sucre et numération des levures à l'hématimètre et en milieu nutritif solide. Le tableau I reproduit ces résultats.

Huit jours après l'ensemencement, tout le sucre est transformé dans le flacon fermentant à l'air.

Le nombre de levures totales est alors maximum et correspond au nombre de cellules réellement vivantes. Au même moment, dans le milieu privé d'air, le nombre de cellules actives n'est plus que la moitié de la population totale. La phase de fermentation rapide est terminée, le milieu titre encore 48 g de sucre, 23 g seront encore transformés pendant les vingt-cinq jours suivants, mais 25 g restent finalement après fermentation dans ce milieu.

L'introduction d'air au deuxième jour intervient au moment où les levures sont dans la phase de multiplication logarithmique et en pleine activité : huit jours après, la totalité du sucre est transformée. L'apport d'oxygène a permis une fermentation dont le rythme et le comportement des cellules sont typiquement aérobies.

TABLEAU I

Influence de l'aération en cours de fermentation

Sucre restant en g par litre — Levures par 1/100 de mm³

		Après 2 jours	Après 3 jours	Après 7 jours	Après 9 jours	Après 12 jours	Après 17 jours	Après 30 jours
Aération continue	*Sucre restant*	*161*	*131*	*22*	*11*	*2*	—	—
	Levures totales	35	50	83	78	76	74	58
	Levures vivantes	33	55	86	90	60	4	0,7
Anaérobiose	*Sucre restant*	*191*	*172*	*54*	*48*	*39*	*31*	*28*
	Levures totales	12	*31*	42	41	39	39	32
	Levures vivantes	10	27	32	25	16	3	0,3
Anaérobiose	*Sucre restant*	*191*	*135*	*27*	*15*	*10*	*2*	—
Aération au 2e jour	Levures totales	13	48	77	72	69	69	48
	Levures vivantes	15	58	84	90	45	3	0,3
Anaérobiose	*Sucre restant*			*55*	*41*	*26*	*20*	*19*
Aération au 4e jour	Levures totales			45	51	39	39	35
	Levures vivantes			45	39	24	4	0,6
Anaérobiose	*Sucre restant*				*63*	*34*	*27*	*27*
Aération au 8e jour	Levures totales				40	38	36	30
	Levures vivantes				20	30	3	0,2

L'aération au quatrième jour se fait dans un liquide déjà riche en alcool, où 15 p. 100 des levures visibles à l'hématimètre ne sont déjà plus susceptibles de se développer. Deux jours après l'introduction d'air, le nombre des cellules vivantes est cependant augmenté de 12 p. 100. La marche de la fermentation est accélérée : en 2 jours, 37 g de sucre sont fermentés pour 26 g dans le témoin anaérobie. Mais au neuvième jour s'amorce une nouvelle diminution du nombre des cellules actives et le liquide gardera 22 g de sucre non transformé.

Dans le milieu qui reçoit une addition d'air au huitième jour de sa fermentation, 50 p. 100 des levures sont déjà inactives. Dans les trois jours qui suivent l'aération, le nombre des cellules capables de former des colonies augmente sensiblement, mais n'atteint jamais que 78 p. 100 du nombre total. Puis suit une nouvelle et rapide diminution du nombre des levures vivantes.

II. — Variation du potentiel d'oxydo-réduction en cours de fermentation

Considérons une solution renfermant une ou plusieurs substances en partie sous leur forme réduite, en partie sous leur forme oxydée, la transformation d'une forme en l'autre étant réversible. C'est un fait d'expérience que si on relie par un fil conducteur une lame de platine placée dans cette solution à une électrode d'hydrogène ou à une électrode au calomel, les liquides étant mis en communication par un pont de jonction, le fil conducteur est traversé par un courant électrique. Lorsqu'il ne passe pas de courant, la différence de potentiel aux bornes de la pile ainsi constituée, est une fonction simple des proportions dans lesquelles se trouvent les formes réduites et oxydées, c'est-à-dire de l'état d'oxydo-réduction du milieu.

Nous avons utilisé pour ces mesures, le potentiomètre Quéré, appareil donnant en lecture directe le potentiel d'oxydo-réduction en millivolts.

Pour obtenir des lectures fidèles, il est indispensable que l'électrode de platine soit en équilibre avec le milieu. A cet effet l'électrode demeure plongée en permanence dans le liquide pendant tout le cours de la fermentation. Il suffit de brancher l'électrode sur l'appareil de mesure et d'introduire un pont de jonction contenant l'électrode au calomel jusqu'au contact du liquide, pour faire les mesures sans aucune manipulation de celui-ci.

Le potentiel d'oxydo-réduction a été ainsi mesuré au cours de la fermentation dans les diverses conditions précitées pour un moût titrant 14° Baumé, ensemencé avec une levure elliptique. Le graphique I donne les courbes obtenues.

a) **Variations du potentiel dans des fermentations conduites à l'air et à l'abri de l'air.** — En milieu aéré, le potentiel d'oxydo-réduction reste stationnaire pendant les deux jours de latence de la fermentation. Il atteint son minimum, ici 97 mv, au quatrième jour, après une chute brusque. A ce moment, les levures sont dans leur phase de plein développement et la moitié de la teneur en sucre est transformée. Le potentiel remonte ensuite progressivement à cause de l'introduction d'air, pour

atteindre une valeur qui dépasse de beaucoup celle du potentiel initial.

En anaérobiose, après la phase stationnaire des premiers jours, la chute du potentiel s'effectue plus lentement. Du quatrième au neuvième jour, le potentiel passe de 175 à 95 mv. A ce moment, la population des levures vivantes est déjà en régression et les 5/6 du sucre sont fermentés. Le potentiel remonte ensuite lentement pour reprendre sa valeur initiale.

Dans les deux conditions d'aération, le potentiel d'oxydo-réduction minimum est du même ordre de grandeur.

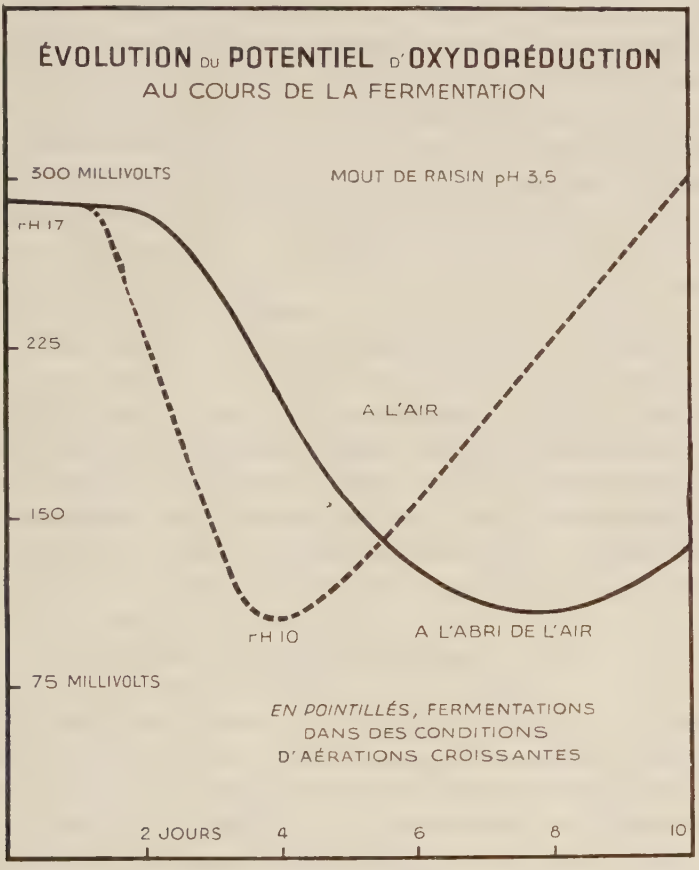


Fig. 1

b) **Variations du potentiel dans un milieu aéré en cours de fermentation.** — Au deuxième jour de sa fermentation, le milieu à l'abri de l'air accuse un potentiel de 260 mv. L'aération à ce moment, provoque une brusque montée à 403 mv. Ce potentiel décroît ensuite, rapidement pen-

dant les premières heures, puis plus lentement, pour atteindre 24 heures après le traitement, un minimum de 115 mv.

Une aération au quatrième jour ou encore au huitième jour provoque des variations de potentiel tout à fait analogues : brusque remontée de 175 à 350 mv environ, suivie d'une chute pour atteindre 24 heures après le minimum de 115 mv. Dans les trois cas, le potentiel minimum est identique.

En outre, une aération effectuée dans un moût où tout le sucre a été transformé et qui contient encore toutes ses levures, provoque la même montée brusque du potentiel, qui décroît ensuite pour revenir au niveau initial.

Comme cela a été constaté pour un grand nombre de microorganismes, il semble qu'il existe un certain parallélisme entre la croissance des levures et l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction. La diminution de ce potentiel correspond à la phase de multiplication logarithmique des levures. Mais si, en présence d'air, la valeur limite du potentiel est atteinte au moment où la population est à son maximum en nombre et en activité, elle est atteinte plus tardivement, en anaérobiose, au moment où le nombre des levures vivantes diminue.

Donc le potentiel peut décroître sans pour cela indiquer une multiplication des levures. En réalité, le potentiel d'oxydo-réduction représenterait d'après Hewitt (9) : « l'état d'équilibre dynamique de la culture entre l'activité des enzymes dans la cellule et les constituants du milieu ». En définitive, en l'état actuel de nos connaissances, il est difficile d'interpréter exactement le sens des variations du potentiel d'oxydo-réduction en cours de fermentation. Elles sont soumises à des séries d'interactions et à des phénomènes très complexes. Nos résultats montrent que le potentiel d'oxydo-réduction n'est lié que d'assez loin à la multiplication des levures et à la vitesse de la fermentation.

III. — Influence du degré alcoolique

Nous avons vu que l'oxygène est un facteur essentiel de la fermentation. L'étude ultérieure d'autres activeurs montrera qu'il est de tous le plus efficace. Cependant, il doit, pour être utilisé avec profit, être fourni à des moments bien déterminés de la fermentation ou plus exactement de la croissance des levures. Ajouté dans le moût de raisin lorsque déjà 50 à 100 g de sucre sont fermentés, il reste pratiquement sans action. C'est donc qu'il n'est pas le seul facteur limitant. Par ailleurs, il ne s'agit pas de carence vitaminique ou azotée : l'addition de vitamines ou d'azote ammoniacal faite simultanément à l'aération, vers la fin de la fermentation, n'a pas modifié l'allure du phénomène.

Les résultats de l'essai suivant semblent apporter quelques éclair-

cissements. Un moût de raisin fermente à 25°C à l'abri de l'air. Au deuxième jour de sa fermentation, on le distribue en trois séries de deux flacons. Chaque série comprend un flacon témoin et un second dont le liquide est aéré. Dans la première série, le moût est gardé tel quel ; dans la seconde, on élève de 4° son titre alcoolique par addition d'alcool pur ; dans la troisième, on élève le degré de 8 unités. Dans chaque série, le degré alcoolique correspond en somme à celui du moût aéré au deuxième, quatrième et huitième jour de l'expérience précédente.

On constate que l'accélération de la fermentation provoquée par l'aération, faite pourtant au même moment, est d'autant moindre que le degré alcoolique est plus élevé. Dans les trois jours qui suivent l'aération, on enregistre une avance de 45 g de sucre fermenté dans la série témoin, de 6 g seulement dans la série alcoolisée à 4° et de 4 g dans la série alcoolisée à 8°. Le nombre des levures est augmenté de 29 000 dans le premier cas et de 5 000 et 6 000 dans les deux autres. Cet essai montre que c'est la richesse du milieu en alcool qui commande l'efficacité de l'aération. Un degré élevé diminue l'activité des levures. En présence d'alcool, la protéosynthèse est ralentie et les levures ne peuvent pas bénéficier de l'oxygène qu'on leur offre.

IV. — Conclusions

Graphiquement, l'évolution du nombre des levures travaillant dans un moût de raisin en fermentation prend l'aspect d'une courbe en forme de cloche. A une période de croissance logarithmique succède une inflexion progressive vers un sommet qui correspond à l'intervention d'un facteur limitant la croissance : épuisement de l'oxygène, des facteurs de croissance, du sucre, inhibition par l'alcool formé. Cette période est suivie d'une chute rapide du nombre des cellules actives. Il importe dans la vinification que cette phase d'inactivation des levures n'intervienne que lorsque le sucre est épuisé. L'accident de vinification, c'est-à-dire l'arrêt avant son terme de la fermentation dans la vinification en rouge par exemple, est particulièrement grave parce que le milieu se trouve privé en très peu de temps de levures capables de se reproduire et de fermenter le sucre. On comprend cette règle pratique de la vinification : en cas d'arrêt de fermentation, il faut intervenir immédiatement.

L'aération en cours de fermentation agit donc, d'une part en favorisant la multiplication cellulaire, d'autre part en stimulant les levures déjà formées. Il est essentiel pour que l'oxygène soit pleinement utilisé, que son introduction parvienne dans le milieu au moment où il peut encore servir d'adjuvant à la croissance des cellules et à leur activité fermentaire, c'est-à-dire au deuxième ou troisième jour de la fermentation anaérobie.

Dès le quatrième jour les levures réagissent plus faiblement, l'accélération produite est médiocre. Au huitième jour, l'aération est presque inefficace, ces délais étant envisagés pour une fermentation à 25°C.

Nous avons pu relier cette perte d'efficacité de l'aération en fonction du temps, à la présence d'alcool. Aux degrés alcooliques élevés, bien avant la perte de la fonction fermentative, la levure perd la faculté de se reproduire, car elle n'est plus capable d'effectuer la synthèse des protéides.

CHAPITRE III

NUTRITION AZOTÉE DES LEVURES

On peut envisager la croissance et la multiplication des levures comme une simple protéosynthèse. C'est dans la mesure où la levure peut utiliser l'azote du milieu que se règle la croissance cellulaire. On sait depuis Pasteur que dans un milieu synthétique approprié, la forme ammoniacale de l'azote peut suffire entièrement à la levure. Lorsque l'ammoniaque est en quantité plus faible, les levures assimilent les acides aminés présents. Grâce à des dosages d'acides aminés effectués sur le moût de bière et sur la bière correspondante, par des méthodes microbiologiques ou chromatographiques, les théories d'Ehrlich (10) et de Stickland (11) ont été récemment revues par Thorne (12). D'après cet auteur, la levure est capable d'assimiler en nature de nombreux acides aminés du moût. Puis, lorsque le mélange restant n'est plus de composition satisfaisante, elle provoque leur désamination selon la réaction d'Ehrlich, ou encore une transamination par oxydo-réduction des acides aminés donateurs et accepteurs d'hydrogène. Ces deux mécanismes ont pour effet de libérer l'ammoniaque, matière première nécessaire à la synthèse des protéines de la levure. Les peptides peuvent être ensuite assimilés, après hydrolyse en acides aminés. (Voir aussi à ce sujet Barton-Wright (13)).

Nous nous sommes attachés à étudier l'action sur l'évolution de la fermentation d'un enrichissement du moût en azote sous ses deux formes, ammoniacale et aminée.

I. — Enrichissement du moût en azote ammoniacal

Le phosphate biammonique est un activeur des levures dont l'emploi est autorisé en vinification. En réalité dans ce sel, contrairement à ce que pensaient ceux qui furent les promoteurs de cette pratique, l'acide phosphorique joue un rôle très secondaire et toute l'impulsion donnée à la fermentation est due à l'azote ammoniacal introduit.

Un moût titrant 215 g de sucre, 122 mg d'azote total et 11 mg d'azote ammoniacal est mis à fermenter à la température de 25°C, à l'air, avec une levure elliptique, après avoir reçu différentes doses d'acide phosphorique sous forme de phosphate monopotassique, ou d'ammoniaque sous forme de chlorure d'ammonium et de phosphate biammonique. Ces additions varient de 20 à 200 mg par litre, en chacun des éléments (PO_4) et (NH_4). On a tracé les graphiques 2 et 3 avec les résultats obtenus.

200 mg par litre d'anion phosphorique facilitent légèrement le départ de la fermentation, mais 12 jours après, la population des levures et la

concentration en sucre restant sont absolument identiques dans ce milieu et dans le témoin.

50 mg par litre d'azote ammoniacal sous forme de chlorure, provoquent une accélération de la fermentation assez marquée, tandis que 100 mg doublent le poids du sucre fermenté en 24 heures. Le nombre total de levures est augmenté de 25 p. 100. Avec 200 mg par litre d'azote ammoniacal, les résultats sont sensiblement les mêmes.

A doses égales en azote ammoniacal, l'activation due au phosphate d'ammoniaque est du même ordre de grandeur que celle observée en présence de chlorure.

D'autres auteurs avaient fait de semblables observations. Smythe

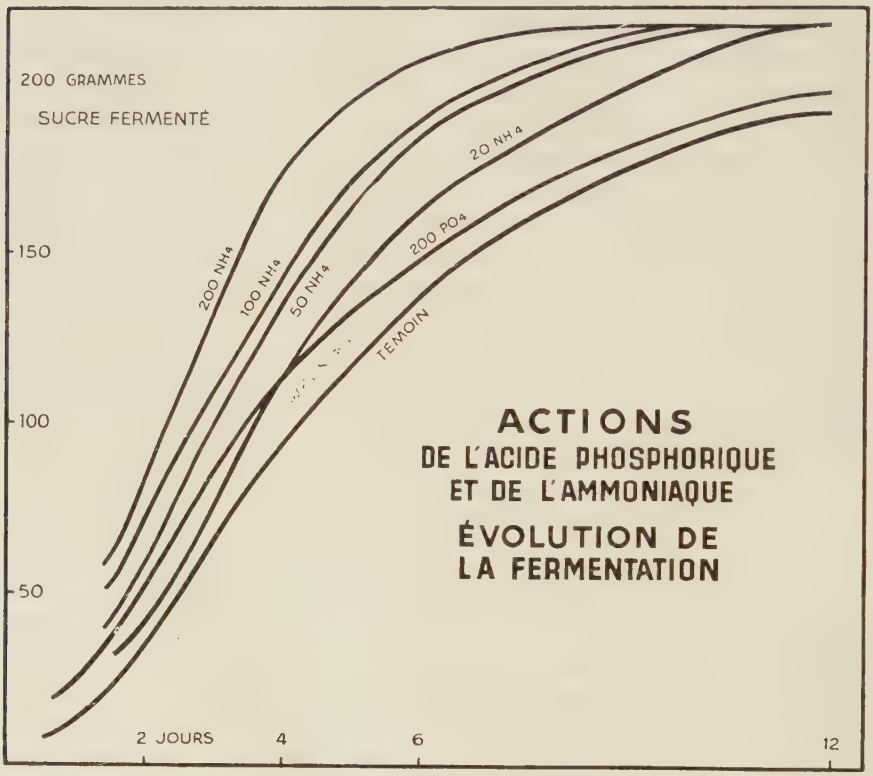


Fig. 2

en 1939 (14), Winzler et ses collaborateurs en 1944 (15) ont montré que les sels d'ammonium activent la fermentation. Massart et Heymans (16) observent que l'adjonction de sels ammoniacaux stimule les réactions productrices d'énergie, y compris la respiration. Enfin récemment, Valaize (17) a montré l'utilité de l'emploi des sels ammoniacaux en vinification.

II. — Mode d'action de l'azote ammoniacal

Un apport supplémentaire d'azote ammoniacal à un moût semble stimuler les levures davantage dans leur pouvoir fermentatif que dans leur multiplication. Parfois à un léger accroissement de population correspond une accélération très importante de la fermentation.

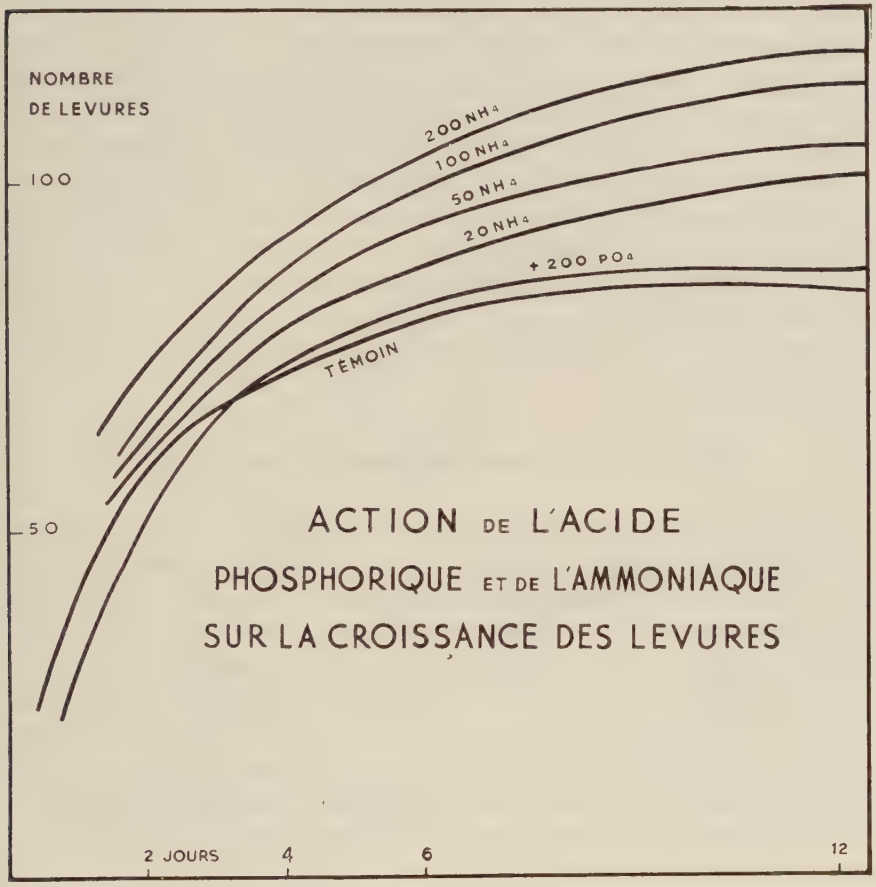


Fig. 3

Nous avons étudié le comportement des levures dans une fermentation se développant en présence d'une addition d'azote ammoniacal de 100 mg par litre, en suivant le nombre des levures vivantes et la population totale. On voit que l'action de l'ammoniaque se manifeste assez tardivement. Le nombre total des levures est légèrement augmenté par rapport au témoin, mais surtout le moment à partir duquel elles ne peuvent plus se reproduire à l'abri de l'air est repoussé de 2 jours, ce qui leur permet de transformer davantage de sucre.

Soulignons que la fixation d'azote ammoniacal par les levures se trouve nettement favorisée par une dissolution d'oxygène. Des dosages d'azote ammoniacal avant et après fermentation du jus de raisin ont montré que les levures pouvaient en utiliser jusqu'à 200 mg par litre lorsqu'elles travaillent à l'abri de l'air et 300 mg lorsqu'elles se développent à l'air. Dans un essai en particulier, les levures ont pu en consommer jusqu'à 735 mg par litre en aérobiose, sans que d'ailleurs leur nombre soit accru d'une manière comparable.

De nombreuses séries d'essais ont été réalisées au cours des vendanges 1951, 1952 et 1953 sur des moûts naturels fermentant spontanément avec leurs levures. Ils consistaient à suivre la fermentation du moût enrichi en azote ammoniacal par rapport à un témoin. On a observé que cette addition favorise toujours la fermentation du moût de raisin, mais l'accélération qui en résulte dépend évidemment pour une part de la richesse initiale du moût en cet élément. On sait que celle-ci est en rapport avec les conditions de la maturation. En 1953 par exemple, en règle générale, un apport de 100 mg d'azote ammoniacal a activé plus nettement la fermentation qu'un enrichissement en vitamines, alors que ce fut le contraire en 1951.

III. — Enrichissement du moût en azote aminé

Nous avons de même essayé l'action d'un certain nombre d'acides aminés ajoutés au moût de raisin à la dose de 100 mg par litre. L'asparagine se montre aussi rapidement assimilable et aussi efficace qu'un enrichissement égal en azote sous forme ammoniacale ; elle est même plus active à l'abri de l'air. Le glycocolle constitue également un excellent aliment pour la levure. La cystéine, la cystine gauche, la d-alanine, provoquent une faible accélération à l'abri de l'air, tandis que le dl-tryptophane retarde légèrement la fermentation. La cystéine retarde de même légèrement la fermentation à l'air. Par ailleurs, le l-tryptophane, la l-leucine, la dl-leucine, la dl-isoleucine, la β-alanine, sont pratiquement sans effet.

IV. — Assimilation azotée en présence d'éthanal et d'acide pyruvique

L'éthanal et l'acide pyruvique sont, on le sait, des produits intermédiaires de la fermentation alcoolique. Ajoutés en petites quantités dans un moût, avant ou au cours de la fermentation, ils modifient les processus chimiques (18) et agissent non seulement sur la croissance des levures et la vitesse fermentaire, mais encore sur l'assimilation azotée de la cellule.

On fait fermenter à 25°C avec un *Saccharomyces ellipsoïdeus*, dans

les deux conditions d'aération, un moût de raisin titrant 210 g de sucre, 253 mg d'azote total et 22 mg d'azote ammoniacal par litre. On le répartit en deux séries : une série témoin et une série enrichie par 150 mg d'azote ammoniacal par litre. Chacune d'elles comprend trois flacons : le premier constitue le témoin, les deux autres reçoivent dès le départ de la fermentation et pendant cinq jours consécutifs, chaque fois respectivement 14 mg par litre d'éthanal et 60 mg par litre d'acide pyruvique ; on utilise

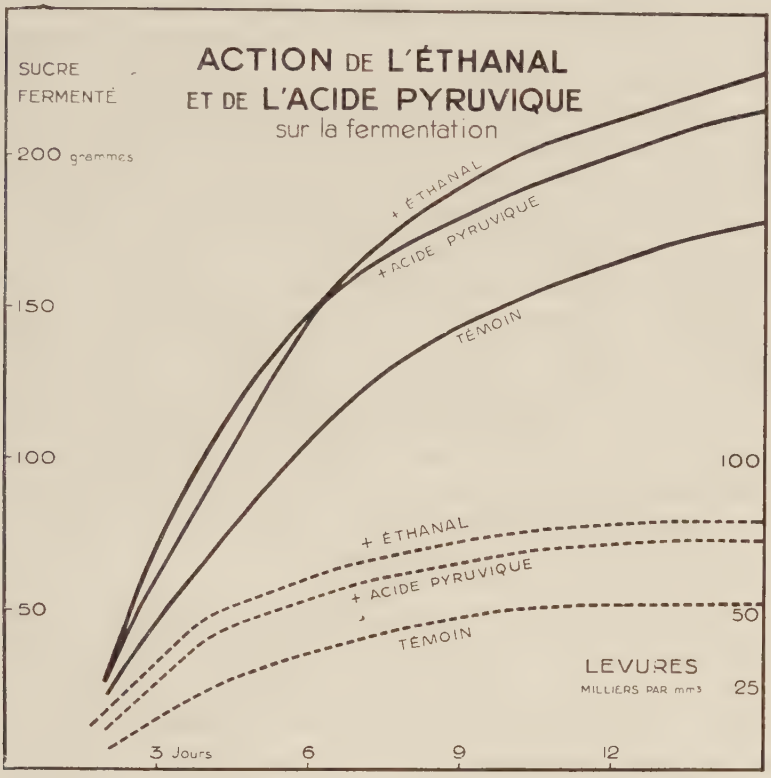


Fig. 4

à cet effet son sel de sodium dont on libère l'acide par la quantité équivalente d'acide sulfurique.

On suit la marche de la fermentation et en fin de fermentation les levures sont comptées, puis séparées du milieu par centrifugation, lavées, recueillies sur filtre taré, séchées et pesées. On dose en outre l'azote ammoniacal restant dans le milieu et l'azote total des levures après attaque Kjeldahl.

Le graphique 4 exprime l'activation de la fermentation et de la croissance des levures obtenue par addition de petites quantités d'éthanal et d'acide pyruvique. Les traits pleins représentent l'évolution de la fer-

mentation, les tirets la croissance des levures. Les graphiques 5, 6, 7 et 8, qui comparent ces produits à divers activeurs vitaminiques, sont encore des exemples des mêmes phénomènes. Ces deux corps possèdent un effet activeur très net. A l'abri de l'air, l'avance par rapport au témoin se chiffre tout au long de la fermentation par 20 à 30 g de sucre transformé. Après quinze jours d'incubation, le nombre des levures est augmenté de 18 p. 100 en présence d'éthanal et de 25 p. 100 en présence d'acide pyruvique. A l'air, où la vitesse de la fermentation est déjà plus grande, l'activation est moindre, mais reste sensible.

Du tableau II qui expose les résultats des diverses analyses, nous pouvons tirer les remarques suivantes :

1° La présence d'éthanal et d'acide pyruvique augmente le nombre des levures, tandis que le poids total des cellules formées ne varie pratiquement pas. Une addition de sel ammoniacal par contre, non seulement favorise la croissance des levures, mais augmente leur poids sec final de 43 p. 100 à l'abri de l'air, et de 50 p. 100 à l'air.

2° Dans un milieu riche en azote ammoniacal, le taux d'azote fixé par les levures est considérablement augmenté lorsqu'on introduit de l'éthanal ou de l'acide pyruvique : respectivement de 45 p. 100 à l'air et de 55 p. 100 à l'abri de l'air. L'apport supplémentaire d'azote ammoniacal à lui seul ne peut modifier ce taux. En somme, dans les conditions normales, les levures ne prélèvent pas davantage d'azote au milieu, lorsqu'on leur offre un excédent d'azote ammoniacal. Cet apport d'azote ammoniacal économise donc, pour ainsi dire, l'azote organique du moût.

Tableau II

Influence de l'éthanal et de l'acide pyruvique sur l'assimilation azotée

Moût de raisin : Sucre 210 g — N total 253 mg — NH_4 22 mg. Fermentation en semi-aérobiose.

	Nombre de levures en milliers par mm³	Poids sec des levures g par l	N prélevé par les levures mg par l	N % du poids sec	NH_4 restant mg par l
	Sans enrichissement en azote ammoniacal				
Témoin	67	1,72	141	8,2	1,7
+ Éthanal	101	1,73	158	9,6	2,1
+ Acide pyruvique	102	1,73	158	9,6	2,1
	Avec addition de 150 mg d'azote ammoniacal				
Témoin	84	2,68	158	5,9	2,8
+ Éthanal	126	2,81	231	8,2	3,5
+ Acide pyruvique	124	2,90	245	8,4	3,1

3° La concentration en azote ammoniacal restant dans les milieux fermentés est toujours très faible. Si donc en présence d'un excès d'éthanal et d'acide pyruvique, la quantité d'azote prélevée dans le moût est fortement augmentée, c'est que ces deux corps permettent l'assimilation de certaines substances azotées qui ne seraient pas utilisées par la levure en leur absence.

L'éthanal et l'acide pyruvique jouent le rôle d'activeurs de la fermentation en diminuant la période de latence. Ce fait avait été signalé par Flanzy et Banos pour l'éthanal en 1938 (19). En présence de quantités suffisantes d'azote ammoniacal, ces corps favorisent la protéosynthèse et la croissance des levures.

Ceci est en accord avec les conceptions de Effront, de Bernhauer et de Fink, exposées par Van Laer (20), qui voient dans l'éthanal le point de départ de la protéosynthèse. Toutefois, l'augmentation du nombre des cellules ne s'accompagne pas d'une augmentation du poids de matière vivante. Tout se passe comme si, contrairement à un apport d'azote ammoniacal qui permet l'accumulation des réserves se traduisant par un accroissement du poids de levures formées, l'éthanal et l'acide pyruvique facilitaient la multiplication cellulaire aux dépens des réserves non azotées.

Dans un autre ordre d'idée, signalons encore que l'addition à un moût de 0,5 à 1 g d'acides nucléique ou désoxyribonucléique active nettement la fermentation.

V. — Conclusions

Bien que le moût de raisin soit un milieu assez riche en substances azotées, un apport supplémentaire d'azote ammoniacal stimule habituellement la fermentation et augmente sensiblement la croissance levurienne. La fixation par les levures de l'azote ammoniacal est étroitement liée à l'importance de l'aération du milieu. Elle est beaucoup plus forte en présence d'oxygène. En outre l'assimilation azotée paraît être sous la dépendance de la présence d'éthanal et d'acide pyruvique, produits intermédiaires de la fermentation alcoolique et qui sont vraisemblablement aussi, les produits intermédiaires de la protéosynthèse. L'importance de l'effet activant produit par ces substances dépend essentiellement de la concentration initiale du milieu en azote. Le plus souvent cependant, l'activation due à l'addition des sels ammoniacaux est inférieure à celle que provoquent dans le même milieu, les activeurs vitaminiques ou d'origine fongique qui sont étudiés plus loin.

CHAPITRE IV

FACTEURS DE CROISSANCE DES LEVURES

La connaissance des besoins en facteurs de croissance des levures concerne à la fois la biochimie et la microbiologie et trouve une application immédiate dans les industries de fermentation. Ceci explique l'intérêt qu'elle a suscité depuis longtemps. On distingue des levures « auxo-autotrophes », qui peuvent se développer et provoquer la fermentation en milieu strictement privé de facteurs de croissance, car on suppose qu'elles sont capables de les synthétiser, et des levures « auxo-hétérotrophes », incapables de se multiplier s'il manque quelque facteur de croissance dans la solution nutritive.

Liebig en 1871 (21) observe le premier que certaines levures ne se développent en milieu synthétique que si l'on ajoute à ce dernier une sorte de stimulant, qui peut être un extrait aqueux stérile de levures. Mais c'est à Wildiers (22), que l'on doit la découverte de ces substances indispensables à la croissance des levures et qu'il dénomme « bios ». Les travaux d'Eastcott (23) sur le mésoinositol marquent le commencement des découvertes relatives à la nature chimique des facteurs de croissance. Williams et Roehm (24) ont étudié ensuite l'action de la thiamine ; Kögl et Tönnis (25) celle de la biotine. En 1933 Williams (26) met en évidence le rôle stimulant de l'acide pantothénique et sept ans après seulement, il parvient à en élucider la composition chimique (27). Schultz, Atkin et Frey (28) d'une part, Eakin et Williams (29) d'autre part devaient en 1939 découvrir la pyridoxine.

On sait maintenant que le « bios » est un mélange de substances universellement répandues dans les règnes animal et végétal et dont cinq constituent des vitamines importantes : la thiamine, la pyridoxine, l'acide pantothénique, la biotine et le mésoinositol. Deux autres corps, l'acide nicotinique (Rogosa, 30) et l'acide p-aminobenzoïque (Rainbow, 31, Cutts et Rainbow, 32) influent aussi sur la croissance de certaines levures. Enfin, récemment Tria et Barnabei (33) ont obtenu la purification partielle d'une substance dont la présence dans les extraits de foie autolysé avait été signalée par Alexander et Subbarow (34) et qui, résistante aux agents chimiques, dialysable, adsorbable sur charbon activé, soluble dans l'eau, active croissance et fermentation des levures du type *Saccharomyces cerevisiae*.

L'interaction des cinq constituants du bios sur la croissance des levures a été étudiée tout d'abord par Williams, Eakin et Snell (35) expérimentant avec trois souches de *Saccharomyces cerevisiae* cultivées en milieu synthétique, à la température de 30°C. Des mesures de troubles effectuées après 72 heures d'incubation montrent que l'inositol, la thia-

mine et la biotine favorisent légèrement la croissance, que la pyridoxine est sans effet ; par contre, aucun développement n'est possible pendant les premières 24 heures en l'absence de biotine. Toutefois, d'après les auteurs, si l'on prolonge le temps d'incubation, biotine et acide pantothénique deviennent interchangeables, et de plus, les levures peuvent croître, quoique faiblement, dans un milieu dépourvu des cinq facteurs.

Leonian et Lilly (36) ont estimé, par pesées des cellules formées, l'influence des cinq vitamines sur 10 souches de *Saccharomyces cerevisiae*, après 72 heures d'incubation à 25°C : une seule exige la thiamine, quatre l'inositol. Les dix levures ont une croissance très diminuée en l'absence d'acide pantothénique et inexistante en l'absence de biotine.

Ces auteurs notent aussi que, après un temps prolongé d'incubation, les levures finissent par se multiplier même dans un milieu totalement privé de vitamines. Ils attribuent cette possibilité de croissance soit à une lente synthèse des vitamines manquantes, soit à un développement des levures à tendance autotrophe permettant la croissance ultérieure des cellules hétérotrophes.

Des essais de classification des levures d'après leurs besoins en facteurs de croissance ont été entrepris par de nombreux auteurs. Schultz, Atkin et Frey (37) ont proposé de répartir les *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces carlsbergensis* en trois groupes d'après leurs besoins en thiamine et thiamine-pyridoxine, dans un milieu contenant déjà les trois autres facteurs. Plus tard (38), ces mêmes auteurs ont préconisé la caractérisation de chaque levure par son « bios number », obtenu en juxtaposant les numéros donnés aux divers facteurs de croissance nécessaires ; ce chiffre définirait ainsi les besoins auxologiques d'une levure. Lochead et Landerkin (39) ont classé 33 souches de 18 espèces de *Zygosaccharomyces* osmophiles d'après leurs besoins en acide pantothénique. Burkholder en 1943 (40) étudiant les besoins vitaminiques de 38 levures appartenant à des espèces très différentes, signale que 15 de celles-ci exigent la thiamine, 14 l'acide pantothénique, 6 l'acide nicotinique, 4 le mésoinositol, 4 la pyridoxine et 36 la biotine. Un *Saccharomyces oviformis* est en outre retenu pour son besoin en pyridoxine en vue de son utilisation éventuelle au dosage microbiologique de ce facteur. En 1948 (41), l'auteur publiait des travaux du même ordre portant sur 110 espèces différentes de levures : la nécessité de la biotine se retrouve dans 87 p. 100 des cas, celle de la thiamine et de l'acide pantothénique dans 35 p. 100, celle de la pyridoxine, de l'acide nicotinique et du mésoinositol dans 12 p. 100 des cas environ. Une levure du type *Kloeckera brevis* pourrait servir au dosage du mésoinositol.

Atkin et Gray (42) ont tenté une classification des levures de brasserie en montrant l'importance de l'inositol pour ces levures et l'équivalence de la thiamine et de la pyridoxine pour certaines d'entre elles. Cette der-

nière observation avait déjà été faite par SCHULTZ pour les levures de boulangerie et, tout récemment, MOSES et JOSLYN ont précisé les conditions de ce phénomène (43). Par contre, la thiamine inhibe la croissance de *Saccharomyces carlsbergensis* utilisée pour le dosage de la pyridoxine, en l'absence de ce dernier facteur, d'après RABINOWITZ et SNELL (44).

SCHOPPER (45) s'est surtout attaché à différencier les levures du genre *Candida*, dont il a fait 4 groupes. MENZINSKY (46) a noté le comportement d'un *Saccharomyces cerevisiae* dont la croissance aérobie est favorisée par la thiamine, l'inositol et la biotine.

Enfin, tout récemment, WHITE et MUNNS (47) ont donné une méthode de détermination qualitative et quantitative des vitamines nécessaires aux levures, au moyen de levures de bière sélectionnées, réagissant en particulier à la biotine, l'inositol et l'acide pantothénique.

Les besoins en facteurs de croissance des levures de vin ont été étudiés par VERONA (48) en Italie et WIKEN (49) en Suisse. Ces deux auteurs concluent de manière sensiblement différente. Le premier opère à la température de 24°C, en milieu solide et note, après une période d'incubation de 8 jours, les exigences en mésoinositol, acide pantothénique et pyridoxine des *Kloeckera apiculata*, la sensibilité à la pyridoxine de *Torulaspora rosei*, l'autotrophie de *Candida pulcherrima*, et en outre, un développement imperceptible de *Saccharomyces ellipsoïdeus* sur milieu non vitaminé. Le travail de WIKEN porte sur trois levures sélectionnées ayant un fort pouvoir alcoogène, utilisées dans la vinification en blanc. Cultivées dans un milieu simple contenant seulement glucose, sels minéraux, sulfate d'ammonium et caséine hydrolysée exempte de vitamines comme source d'azote, ces levures, après un temps d'incubation variant de 24 à 144 heures, se montrent absolument auxo-autotrophes, continuant à se développer en milieu dépourvu de vitamines après 120 repiquages au cours des 8 mois pendant lesquels s'est poursuivie l'expérimentation. En conclusion, l'auteur met en garde contre une généralisation trop étendue de l'auxo-hétérotrophie des levures cultivées, opposée à l'auxo-autotrophie des levures sauvages.

En résumé, les besoins en facteurs de croissance des levures de bière et de boulangerie ont été déterminés dans des milieux entièrement synthétiques de composition variable, à température assez élevée, soit 30°C, et à pH 5. L'estimation de la croissance est réalisée par pesées de la masse de levures formées ou, le plus souvent, par mesure néphélométriques après un temps d'incubation relativement court, qui ne dépasse pas 72 heures. Les travaux consacrés aux besoins vitaminiques des levures de vin sont plus rares ; les auteurs qui s'y sont attachés ont senti la nécessité de prolonger le temps d'observation, qui varie alors de 6 à 8 jours.

I. — Besoins en facteurs de croissance des levures de vin cultivées en milieu synthétique

Notre étude des besoins en facteurs de croissance des levures du Médoc et de Saint-Emilion se propose un but à la fois pratique et théorique : d'une part, connaître les besoins réels de telles levures ; d'autre part, apporter des informations complémentaires susceptibles d'aider à une classification générale des levures du Bordelais entreprise par ailleurs (50) ; enfin, rechercher des souches de levures dont la réponse à un facteur bien déterminé est suffisamment nette pour que cette levure soit utilisable au dosage de ce facteur.

Il était indispensable d'étudier l'influence de chaque facteur, non seulement sur la croissance, mais aussi, sur la fermentation des levures.

Les essais ont été conduits avec un milieu de culture et selon un mode opératoire différents de ceux des auteurs précédents. On s'est rapproché des conditions de travail des levures de vin dans la pratique, et leur comportement a été suivi par trois techniques différentes.

Milieu de culture. — Il ne contient que des produits cristallisés. On a remplacé les additions de traces de métaux et de sels minéraux par l'emploi de cendres de levures. La composition du milieu est la suivante pour 1 litre :

Saccharose (ou glucose)	100 g
Phosphate monopotassique	2 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Asparagine	2 g
Acide citrique	6 g
Cendres de 300 g de levure pressée de boulangerie.	

La solution est ajustée à pH 3,5 par addition de potasse.

Mode opératoire. — Dans ce milieu de base, les facteurs de croissance sont introduits aux doses suivantes : 0,2 mg par litre pour la thiamine, la pyridoxine, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique et l'acide p-aminobenzoïque ; 20 γ pour la biotine et 10 mg pour le mésoinositol.

On opère en tubes à essai calibrés. A 10 cm³ du milieu de base stérilisé, on ajoute les vitamines en solution stérile, de façon à ce que chaque tube reçoive tous les facteurs de croissance, sauf un. Uu tube ne reçoit aucun facteur de croissance, un autre tube les reçoit tous. Chaque série comporte donc 9 tubes et chaque essai est réalisé en double. On ensemence avec une goutte calibrée d'un levain préparé en diluant au centième dans l'eau stérile, du moût de raisin fermentant depuis 2 jours avec la levure à étudier. La population de départ est de 1 à 2 levures par mm³.

Les tubes à essai sont obturés par un bouchon de caoutchouc traversé par un tube de verre rempli de coton et terminé extérieurement par

une effilure très fine. Ce système d'obturation permet un dégagement facile du gaz carbonique et réduit au minimum l'évaporation du liquide. Les fermentations se poursuivent dans ces conditions, en semi-anaérobiose. Les tubes sont placés à l'étuve à 25°C.

Le comportement des levures est suivi de trois façons : 1° Dans les premières heures, on évalue la croissance par des mesures néphélométriques à l'électrophotomètre effectuées directement sur les tubes après agitation ; les troubles sont exprimés en pourcentage de lumière transmise. 2° La marche de la fermentation est suivie par pesées des tubes à intervalles réguliers, tous les deux jours par exemple. On corrige la perte de poids de celle, toujours faible, d'un tube d'eau distillée obturé de la même façon ; on poursuit les pesées jusqu'à la fin de la fermentation pour en fixer la limite. 3° On procède alors à une numération des levures au compte-globules de Malassez ; ce chiffre renseigne sur la croissance totale.

Ces trois mesures sont nécessaires et les seules mesures néphélométriques du début, utilisées jusqu'ici par les auteurs, donnent des renseignements incomplets et parfois une idée fausse de ce que sera la multiplication cellulaire totale. Ainsi pour la plupart des *Saccharomyces*, on pourrait conclure des lectures à l'absorptiomètre effectuées dans les premières heures, que la biotine ne joue aucun rôle sur la croissance. Les numérations finales montrent au contraire que, sans biotine, la multiplication des levures reste très incomplète. De même, croissance et vitesse de fermentation ne sont pas obligatoirement des phénomènes parallèles ; l'absence de biotine qui diminue jusqu'à trois fois la croissance totale, est absolument sans effet sur la vitesse et la limite de la fermentation.

Notre travail a porté au total sur 54 souches de levures appartenant à 8 espèces différentes, soit 40 levures du Bordelais isolées et caractérisées dans nos laboratoires, et 14 levures provenant de collections étrangères (Centraalbureau voor Schimmelcultures de Delft et Institut microbiologique de Pérouse). Nous exposerons successivement, pour chaque genre et espèce, les vitamines nécessaires à la croissance et à la fermentation. Les tableaux III, IV, V et VI donnent des exemples des résultats obtenus.

Saccharomyces ellipsoïdeus. Ces levures sont parfaitement capables de se multiplier dans un milieu absolument privé de vitamines, et il est possible d'entretenir des souches dans un tel milieu par des repiquages successifs. Ces levures sont donc auxoautotrophes. Cependant elles sont plus ou moins fortement affectées dans leur croissance par l'absence d'acide pantothénique, de biotine et de mésoinositol, et dans leur fermentation par l'absence d'acide pantothénique surtout, et de thiamine à un degré moindre (tableau III). Le manque d'acide pantothénique retarde de 4 à 6 jours le départ de la fermentation ; le retard est de 5 à 7 jours en l'absence totale de vitamines. Mais dans les deux cas, la fermentation, dès qu'elle est déclarée, se poursuit à une vitesse normale jusqu'à complète trans-

Tableau III

Besoins en facteurs de croissance de quelques Saccharomyces

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.
Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	Sacch. ellipsoïdeus 29					*Sacch. uvarum* 10					*Sacch. italicus* 125				
	Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg		
	Trouble	Nbre de levures	3 jours	4 jours	7 jours	Trouble	Nbre de levures	3 jours	5 jours	8 jours	Trouble	Nbre de levures	4 jours	7 jours	9 jours
Sans vitamine	70	6	24	47	136	98	4	13	55	108	100	20	5	58	122
Avec toutes les vitamines	6	58	309	423	468	25	110	316	439	462	24	76	350	452	465
Sans biotine	6	19	230	360	465	25	75	235	401	454	14	45	322	445	460
Sans pyridoxine	6	48	316	446	468	20	109	343	451	464	29	58	198	425	461
Sans thiamine	20	41	161	378	465	52	77	193	437	465	62	60	108	421	460
Sans pyridoxine-thiamine	24	46	181	361	464	50	88	202	434	477	66	62	118	412	446
Sans ac. pantothénique	50	15	69	175	400	31	52	189	396	460	100	40	5	192	312
Sans mésoinositol	20	29	196	252	460	95	56	17	205	450	51	46	188	427	451
Sans ac. nicotinique	8	54	323	440	464	25	88	307	445	462	31	38	96	306	363
Sans P.A.B. (1)	8	54	355	451	460	25	100	295	426	465	22	66	281	446	460

(1) Acide p. aminobenzoïque.

Tableau IV

Besoins en facteurs de croissance des Kloeckeras et Hanseniaspora

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.
Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	Kloeckera apiculata 4					*Hanseniaspora apuliensis* 106					*Kloeckera magna* 102				
	Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg		
	Trouble	Nbre de levures	7 jours	10 jours	15 jours	Trouble	Nbre de levures	6 jours	11 jours	18 jours	Trouble	Nbre de levures	5 jours	7 jours	12 jours
Sans vitamine	100	0	0	0	0	98	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Avec toutes les vitamines	44	17	184	240	315	28	44	276	406	464	41	50	221	245	460
Sans biotine	46	17	123	165	241	43	41	276	383	464	51	17	159	209	454
Sans pyridoxine	68	9	118	174	256	75	5	82	204	266	64	22	30	71	254
Sans thiamine	74	4	46	59	88	83	5	20	37	61	90	5	10	19	36
Sans thiamine-pyridoxine	80	4	30	69	138	90	5	47	76	96	91	43	14	54	306
Sans ac. pantothénique	100	0	0	0	0	98	2	35	73	95	100	30	9	145	422
Sans mésoinositol	100	0	0	0	0	95	0,1	13	15	31	100	20	9	149	438
Sans ac. nicotinique	90	0,1	34	43	60	86	2	34	57	87	100	43	25	232	449
Sans P.A.B. (1)	50	9	143	185	238	28	33	267	382	460	48	46	154	246	441

(1) Acide p. aminobenzoïque.

Tableau V

Besoins en facteurs de croissance des Pichia, Hansenula, Torulopsis

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.
Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	Pichia fermentans 20					*Hansenula anomala* 29					*Torulopsis stellata* 39				
	Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg		
	Trouble	Nbre de levures	6 jours	9 jours	15 jours	Trouble	Nbre de levures	5 jours	8 jours	15 jours	Trouble	Nbre de levures	5 jours	8 jours	15 jours
Sans vitamine	22	48	209	271	395	28	70	78	92	214	24	26	56	60	83
Avec toutes les vitamines	15	73	230	324	460	36	150	117	258	352	8	44	169	188	339
Sans biotine	20	53	212	286	433	32	103	92	175	246	12	32	53	65	87
Sans pyridoxine	15	70	171	243	360	30	116	69	140	236	10	38	51	61	84
Sans thiamine	20	64	129	219	344	22	101	63	109	176	14	35	96	109	141
Sans thiamine-pyridoxine	16	64	152	230	359	20	103	71	153	285	10	38	65	71	95
Sans ac. pantothénique	15	39	194	263	418	20	118	121	247	434	24	39	42	49	65
Sans inositol	17	79	189	286	443	20	93	97	180	318	10	39	87	93	118
Sans ac. nicotinique	20	66	147	217	357	30	103	68	131	246	8	28	61	71	98
Sans P.A.B. (1)	19	76	219	332	460	30	110	97	198	388	8	29	50	62	77

(1) Acide p. aminobenzoïque.

Tableau VI

Besoins en facteurs de croissance des Saccharomycodes, Torulaspora et Candida

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.
Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	Saccharomycodes ludwigii 100					*Torulaspora rosei* 101					*Candida pulcherrima* 33				
	Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg		
	Trouble	Nbre de levures	5 jours	8 jours	13 jours	Trouble	Nbre de levures	5 jours	7 jours	12 jours	Trouble	Nbre de levures	5 jours	7 jours	15 jours
Sans vitamine	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	73	20	45	82	162
Avec toutes les vitamines	32	23	223	369	460	24	65	148	261	465	80	138	146	246	439
Sans biotine	32	15	185	301	416	31	29	146	245	446	73	25	58	83	222
Sans pyridoxine	70	8	35	93	264	58	13	35	76	175	70	102	141	225	435
Sans thiamine	81	15	72	166	331	69	21	67	167	346	70	100	120	245	463
Sans thiamine-pyridoxine	98	0,3	16	19	24	94	4	16	20	31	70	83	135	252	444
Sans ac. pantothénique	1 000	15	19	38	203	41	41	143	278	450	68	110	125	214	455
Sans mésoinositol	39	11	186	298	430	37	43	133	264	446	68	90	132	225	417
Sans ac. nicotinique	96	1	19	26	35	54	49	158	267	462	83	86	132	290	458
Sans P.A.B. (1)	30	13	258	383	467	24	52	144	235	462	74	93	150	239	460

(1) Acide p. aminobenzoïque.

formation du sucre. En fin de fermentation, dans le milieu dépourvu de vitamines, le nombre des levures reste très faible. Suivant les souches, il représente de la moitié au dixième de la population obtenue en présence des 7 vitamines.

Les *Saccharomyces* appartenant aux espèces *steineri*, *chevalieri*, *bayanus*, *oviformis*, *carlsbergensis*, sont également autotrophes et les mêmes vitamines activent leur croissance et leur fermentation. *Saccharomyces italicus* est assez sensible à la carence en acide nicotinique, et *Saccharomyces fructuum*, est gêné par le manque de pyridoxine et d'acide pantothénique.

Enfin *Saccharomyces uvarum* (tableau III), également autotrophe, voit sa croissance influencée par l'absence d'acide pantothénique, de mésoinositol et de biotine ; la fermentation est retardée surtout en l'absence de mésoinositol (retard identique à celui apporté par le manque complet de vitamines) et, à un degré moindre, d'acide pantothénique et de thiamine.

Kloeckera apiculata (tableau IV). Ces levures sont incapables de se multiplier et de fermenter dans un milieu dépourvu de vitamines, ou en l'absence de mésoinositol. Elles sont auxohétérotrophes. Leurs exigences vis-à-vis de l'acide pantothénique, de l'acide nicotinique et de la thiamine sont plus ou moins marquées. L'absence des deux premiers facteurs peut rendre impossible tout développement levurien. La biotine et l'acide p-aminobenzoïque activent très légèrement leur croissance, mais n'ont aucun effet sur leur fermentation.

Kloeckera magna (tableau IV). Cette souche, également hétérotrophe, se singularise par son exigence en thiamine. Dans un milieu dépourvu de ce facteur, la croissance est le dixième de celle qu'on observe en milieu contenant les 7 vitamines et la fermentation est pratiquement nulle. Elle est de plus, influencée dans sa croissance, mais plus faiblement, par l'acide pantothénique, la biotine et la pyridoxine. Ces derniers facteurs de croissance activent sa fermentation. Par contre la biotine et l'acide p-aminobenzoïque sont sans effet.

Kloeckeraspora osmophila. Cette souche a donné, dans un milieu dépourvu de vitamines, un développement faible (500 levures par mm^3) et la fermentation a porté au total sur une trentaine de grammes de sucre. Elle est cependant capable de se passer de vitamines. Tous les facteurs agissent sur sa croissance et sa fermentation à des degrés divers. Elle s'écarte assez nettement des levures du genre *Kloeckera*. Par contre une levure apiculée sporogène du genre *Hanseniaspora* (tableau IV) est hétérotrophe et ses besoins vitaminiques sont identiques à ceux des *Kloeckeras*.

Pichia fermentans fermente très lentement le sucre (tableau V) et présente des besoins très faibles. En l'absence complète de vitamines, elle reste capable de transformer la totalité du sucre du milieu.

Le caractère d'autotrophie de *Pichia membranaefaciens* est moins marqué. L'absence totale de vitamines diminue de moitié la croissance et ne permet qu'une fermentation très incomplète du sucre. Ces levures sont particulièrement sensibles à la biotine en ce qui concerne leur croissance et à la thiamine en ce qui concerne leur fermentation.

Zygosaccharomyces florentinus s'est montré affecté dans sa croissance par le manque de biotine, d'acide nicotinique et de mésoinositol, et dans sa fermentation par la carence en acide pantothénique et en mésoinositol.

Saccharomycodes ludwigii (tableau VI), outre son hétérotrophie, se caractérise par ses besoins simultanés en thiamine et pyridoxine. Tandis que l'absence de l'un ou de l'autre facteur n'affecte que très légèrement sa croissance, le couple est absolument indispensable à son développement et à sa fermentation. Thiamine et pyridoxine sont donc interchangeables pour cette levure. Par ailleurs, l'acide nicotinique, la pyridoxine et l'acide pantothénique activent légèrement sa fermentation.

Saccharomycodes bisporus est également auxohétérotrophe. Tous les facteurs sont nécessaires à une croissance optimum, mais la biotine et le mésoinositol sont de tous les plus actifs. On retrouve l'influence marquée du couple pyridoxine-thiamine. L'acide pantothénique est nécessaire à une bonne fermentation ; son absence prolonge de 10 jours environ la phase de latence.

Torulaspora rosei est auxohétérotrophe (tableau VI). Alors que cette levure se multiplie en l'absence de thiamine ou de pyridoxine, elle ne peut plus se développer lorsque ces deux facteurs de croissance viennent à manquer simultanément. Le mésoinositol et la biotine aussi sont nécessaires, mais à un degré moindre.

Torulaspora delbruckii par contre est autotrophe. Sa croissance est surtout retardée par l'absence de mésoinositol, de pyridoxine et d'acide pantothénique, sa fermentation par le manque de mésoinositol, dont l'absence empêche la complète transformation du sucre. L'influence du groupe pyridoxine-thiamine montrant que la levure est capable d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre de ces vitamines, est assez marquée.

Torulopsis bacillaris est dans le genre Torulopsis la seule levure hétérotrophe que nous ayons rencontrée. Le mésoinositol est en effet pour elle un facteur indispensable, tandis que la biotine et l'acide pantothénique activent seulement sa croissance, et le groupe pyridoxine-thiamine sa fermentation.

Torulopsis stellata est par contre auxoautotrophe (tableau V). Ses besoins varient selon les souches. Pour deux d'entre elles, l'acide *p*-aminobenzoïque est le facteur le plus influant, et ce sont les seules levures que nous ayons trouvées possédant ce caractère.

Torulopsis famata est de même nettement auxoautotrophe et sa

croissance est activée par la thiamine, la pyridoxine et la biotine. Ces mêmes facteurs, le mésoinositol et l'acide nicotinique activent sa fermentation.

Pour *Torulopsis utilis* enfin, si aucun n'est absolument indispensable, tous les facteurs lui sont utiles et en particulier le mésoinositol, l'acide pantothénique et la thiamine.

Candida pulcherrima est une levure autotrophe (tableau VI) dont la croissance cependant est plus ou moins activée par tous les facteurs, et dont la fermentation est plus rapide en présence de biotine.

En résumé, à l'exception des levures de l'espèce *Torulopsis* qui sont relativement hétérogènes dans leurs exigences vitaminiques, toutes les souches de levures étudiées se comportent à quelques légères variantes près, d'une manière très comparable dans le cadre d'une même espèce.

D'une manière générale :

— Les *Saccharomyces* sont auxoautotrophes, mais certaines vitamines, et en premier lieu l'acide pantothénique, activent fortement leur croissance.

— Les *Kloeckeras* sont hétérotrophes et l'absence de mésoinositol interdit tout développement.

— Les *Pichias* et les *Hansenulas* n'ont pratiquement aucun besoin en facteurs de croissance.

— Les *Saccharomycodes* ne peuvent se développer s'il manque au milieu de culture à la fois la thiamine et la pyridoxine.

— Les *Torulasporas* sont sensibles à l'absence du groupe pyridoxine-thiamine et, de plus, au mésoinositol. L'auxoautotrophie n'est pas générale dans ce genre.

Les *Candidas* sont auxoautotrophes ; la biotine active leur fermentation.

Il semble que le caractère de chaque espèce soit assez constant pour aider à la classification des levures.

En outre, le dosage de certaines vitamines peut être envisagé au moyen de quelques levures étudiées, présentant des exigences très accusées pour un facteur de croissance. C'est ainsi que le dosage de l'acide pantothénique est possible avec une quelconque des levures de l'espèce *Saccharomyces ellipsoïdeus* ou *Zygosaccharomyces bisporus*. Les dosages du mésoinositol et de l'acide nicotinique s'effectueront avec des *Kloeckeras apiculatas* ; *Kloeckera magna* pourrait trouver son utilisation dans le dosage de la thiamine ; *Saccharomyces fructuum* dans celui de la pyridoxine. White et Munns (47) ont basé de la même manière des techniques de dosage microbiologique des vitamines sur la « réponse » de certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae.*

L'application à certaines espèces de levures, en particulier aux *Saccharomyces cerevisiae,* du qualificatif d'auxoautotrophes, nous met en

contradiction avec certains auteurs qui estimaient les besoins en facteurs de croissance des levures après une période très courte d'incubation. Cependant, plusieurs auteurs ont signalé que, si on leur en donne le temps, les *Saccharomyces* se développent fort bien en l'absence totale de vitamines. Nos observations concordent de même parfaitement avec celles de WIKEN à ce sujet.

II. — Influence de l'enrichissement du moût de raisin en facteurs de croissance

Les besoins en facteurs de croissance des levures de vin étant déterminés, il nous reste à connaître quelle est la richesse moyenne du moût de raisin en ces différents facteurs et quelle accélération de la fermentation on peut obtenir par un enrichissement des moûts.

Nous ne possédons que peu de données précises sur la composition vitaminique du jus de raisin. La concentration en thiamine a fait l'objet de plusieurs études (GENEVOIS, 51) ; elle est de 0,2 à 0,5 mg par litre. PERLMAN et MORGAN (52) chiffrent de 0,6 à 1,98 mg la teneur en pyridoxine et de 0,9 à 1,5 mg celle en acide pantothénique. Récemment CASTOR (53) a déterminé par des méthodes microbiologiques, les variations des divers facteurs de croissance au cours de la fermentation d'un moût de raisin. D'après cet auteur, les taux d'acide pantothénique, de pyridoxine, de biotine et d'acide nicotinique diminuent au cours de la fermentation ; l'acide *p*-aminobenzoïque diminue également, mais revient à son taux initial en fin de fermentation ; le mésoinositol existe en très grande quantité dans le raisin et les besoins des levures en ce facteur sont si faibles que le taux de mésoinositol n'est pas modifié par la fermentation.

Enfin à la Station de Recherches de Wädenswill, dans une étude de la fermentation des jus de pommes et de poires, il a été montré que l'addition de 0,5 mg de thiamine et de 10 gammas de biotine active autant la fermentation que 200 mg de sulfate d'ammoniaque (54).

Nous avons essayé de déterminer l'effet d'une addition des divers facteurs de croissance, ajoutés individuellement ou en groupe, dans de nombreux moûts de raisins blancs et rouges, de provenances diverses, prélevés au cours des récoltes des trois dernières années, et fermentant soit avec les levures du cru, soit, après élimination de ces dernières, par filtration, avec une race pure de levures.

a) **Efficacité de la thiamine.** — L'addition de pyridoxine, d'acide pantothénique, d'acide nicotinique, seuls ou associés, sont sans effet sur la fermentation du moût de raisin. On peut donc penser que le moût en

contient toujours suffisamment. Par contre, la biotine, le mésoinositol et surtout la thiamine agissent presque toujours de manière favorable, mais avec une intensité très variable suivant le moût expérimenté et en particulier, l'année de la récolte. La vitamine B_1 est, de tous les facteurs de croissance, le plus efficace. Son emploi a été préconisé en vinification par J. Ribéreau-Gayon et E. Peynaud (55).

Voici un des essais types effectué avec un moût de raisin titrant 172 g de sucre par litre, provenant de la récolte 1951. Les levures du cru sont éliminées par centrifugation et filtration. On ensemence avec quelques gouttes d'un levain frais de la levure nº 51, dont les besoins en facteurs de croissance sont connus : la biotine est utile à sa croissance, l'acide pantothénique à sa fermentation. On laisse fermenter à l'air à la température de 25ºC, après avoir fait au moût l'une des additions suivantes, par litre : 25 γ de biotine, 10 mg de mésoinositol, 0,5 mg de thiamine, et des trois facteurs simultanément à ces mêmes doses. Le tableau VII reproduit les résultats obtenus. La biotine et le mésoinositol montrent sensiblement le même pouvoir activeur. Mais la présence de thiamine confère à la fermentation une avance d'une vingtaine de grammes de sucre par rapport à celle qui s'obtient en présence de biotine et de mésoinositol, et d'une quarantaine de grammes par rapport à la fermentation témoin. Cette avance se poursuit tout au long du phénomène. Au troisième jour, le nombre de levures est accru de 43 p. 100. Les trois vitamines associées n'agissent pas plus fortement que B_1, et il est clair que toute l'impulsion donnée à la fermentation par ce groupe revient à cette dernière.

Depuis les premières expériences effectuées à la Station œnologique de Bordeaux, de nombreux auteurs ont repris cette étude. Casas en Espagne (55 bis), mais surtout Garino-Canina en Italie (56), confirment l'efficacité de la thiamine, qu'ils considèrent égale ou supérieure à celle d'un sel ammoniacal. J. Ribéreau-Gayon et P. Ribéreau-Gayon (57) ont noté en 1952, dans la vinification en rouge, un meilleur achèvement de la fermentation après addition de vitamine B_1, de même qu'une accélération sensible dans la vinification en blanc (58). Récemment Dupuy et Flanzy (59) ne retrouvent pas d'une façon générale l'augmentation du nombre des levures, l'accélération de la fermentation et l'augmentation de la résistance à l'alcool, mais ne concluent pas cependant à l'inutilité de la thiamine comme adjuvant de la fermentation vinaire.

b) **Mode d'action de la thiamine.** — On sait depuis 1936 (Lohmann et Schuster) que la cocarboxylase est un ester pyrophosphorique de la thiamine. La thiamine détermine donc la décarboxylation de l'acide pyruvique en éthanal, et accélère de ce fait la vitesse de la fermentation. Mais, comme nous l'avons observé, la vitamine B_1 agit aussi sur la crois-

sance des levures ; elle en augmente la population et prolonge la durée de leur activité. Un essai dans lequel on a compté à la fois les cellules vivantes et les cellules totales, a montré qu'au dixième jour d'une fermentation anaérobie par exemple, la moitié des cellules sont inactives dans le témoin ; en présence de 0,5 mg par litre de vitamine B_1, cette proportion n'atteint au même moment que 21 p. 100 du nombre total relevé à l'hématimètre.

L'addition de 0,5 mg par litre provoque généralement l'activation optimum, mais la thiamine agit aussi, quoique plus faiblement, à dose moindre et même à partir d'additions de 0,1 mg par litre dans certains moûts. Son action reste toujours légèrement inférieure cependant à celle des activeurs d'origine fongique étudiés au chapitre V (voir fig. 7, 8, 9 et 10).

L'accélération de la fermentation provoquée par l'enrichissement du moût en vitamine B_1 se montre très variable d'une année à l'autre. Il semble que certaines années, comme en 1951,une insuffisance de maturité conduisant sans doute à un taux plus faible de vitamine B_1 dans le raisin, l'addition de cette vitamine à la vendange soit très avantageuse, tandis que pour d'autres récoltes, de meilleure maturité, comme en 1953, l'adjonction de la vitamine B_1 ne présente pratiquement aucune utilité.

TABLEAU VII

Addition de divers facteurs de croissance au moût de raisin
Sucre du moût, 172 g par l.

		3 jours	5 jours	8 jours
Témoin	Sucre fermenté.....	43	128	
	Nombre de levures.....	82		125
+ 25 γ p/l Biotine	Sucre fermenté.....	62	148	
	Nombre de levures.....	105		155
+ 10 mg p/l Inositol	Sucre fermenté.....	62	148	
	Nombre de levures.....	102		145
+ 0,5 mg p/l Vitamine B1	Sucre fermenté.....	91	169	
	Nombre de levures.....	113		178
+ 25 γ Biotine + 10 mg Inositol + 0,5 mg Vitamine B1	Sucre fermenté.....	90	170	
	Nombre de levures.....	115		176

Quoiqu'il en soit, de nombreux essais, réalisés sur des moûts très différents, fermentant avec divers Saccharomyces, ont montré que la thiamine est de tous les facteurs de croissance celui qui favorise le mieux la fermentation du moût de raisin, particulièrement à ses débuts. Souvent le jus de raisin ne possède pas assez de vitamine B_1 pour donner à la fermentation la vitesse maximum et conduire à l'achèvement le plus

sûr. Selon la composition du moût, l'activation produite par l'addition de B_1 est plus ou moins forte, mais toujours réelle. Ces qualités, jointes à son prix de revient relativement peu élevé, pourraient en faire un activeur utile dans la vinification.

III. — Conclusions

La connaissance des besoins en facteurs de croissance des levures de vin en milieu synthétique, apporte une aide précieuse à la caractérisation des levures et à leur classification ultérieure. Elle permet, en outre, de retenir certaines d'entre elles, dont la réponse à un facteur est bien caractéristique, en vue d'un dosage microbiologique de ce facteur.

De nombreuses expériences reproduites pour trois récoltes, d'autre part, semblent désigner la thiamine comme un activeur souvent efficace de la fermentation alcoolique du moût de raisin. Cependant, les règles d'utilisation pratique de cette vitamine en vinification restent encore à établir. Il faudrait pour cela connaître avec précision les besoins quantitatifs des levures en jeu, et surtout la composition vitaminique exacte des milieux. Il y aurait lieu d'établir une documentation abondante concernant la richesse des raisins en vitamines du groupe B. Le présent travail sur les facteurs de croissance est d'ailleurs une contribution à la solution de ces nouveaux problèmes.

CHAPITRE V

ACTIVEURS DE LA FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

Dès 1932, Nielsen et Hartelius (60) ont montré la présence dans le liquide de culture d'*Aspergillus niger* de substances capables d'accélérer la croissance des générations successives de ce champignon. Ils découvrirent plus tard que ces substances sont également actives sur *Saccharomyces cerevisiae* (61) et sur d'autres espèces de levures (62). Ils distinguent deux groupes parmi ces substances, celles qui font partie du Bios proprement dit et celles qui constituent l'activeur d'*Aspergillus*. Ce facteur de croissance spécial, différent des vitamines du groupe B étudiées dans le chapitre précédent, serait très répandu. Il est thermostable et résiste aux conditions d'acidité ou d'alcalinité, il est soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool absolu et l'éther.

Ce facteur n'est jamais indispensable aux levures, mais leur nombre et la vitesse de fermentation dans certains milieux peuvent être doublés en sa présence. Ce facteur est donc différent du « facteur Z » de Von Euler (137), qui accélère la fermentation sans modifier la croissance. Le facteur Z a été rapproché de la thiamine par Kögl et Borg (138) ; il a été signalé par Brisou et Genevois dans le jus de raisin et les liquides fermentés (139).

Kiessling devait préciser en 1949 (63), le mode d'action de l'activeur d'*Aspergillus* : il a pour effet d'augmenter considérablement au début de la fermentation, la formation et l'accumulation des triosephosphates, et par là d'accélérer la fermentation du sucre. Ribéreau-Gayon, Peynaud et M. Lafon ont démontré que cet activeur facilitait la fermentation glycéropyruvique, ce qui se traduit par une modification profonde des taux des produits secondaires (64) ; d'autre part, la quantité d'acide acétique formée par les levures est diminuée tandis qu'augmente la production d'acide succinique.

L'application à la pratique de la vinification d'une poudre de mycélium d'*Aspergillus niger* contenant l'activeur de Nielsen, a été préconisée (65). Ribéreau-Gayon et Peynaud dans une série d'essais menés au laboratoire et dans la pratique ont étudié l'emploi de cet activeur fongique en vinification (55).

Nous reprenons nous-même ici cette étude. D'autre part, nous avons observé que le mycélium de *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin lavé, desséché et pulvérisé, présente exactement les mêmes propriétés que le mycélium d'*Aspergillus niger*.

D'autres recherches poursuivies sur les mycéliums de Pénicilliums

ont permis d'étendre également à ceux-ci la propriété d'agir favorablement sur la fermentation alcoolique. La plupart des moisissures se montrent donc capables de synthétiser l'activeur de Nielsen.

I. — Action de l'activeur d'Aspergillus niger sur la fermentation alcoolique

Le mycélium frais d'*Aspergillus* a été séché à basse température, moulu finement, lavé à l'alcool qui en extrait les lipides et enlève l'odeur de moisi caractéristique. Il se présente sous forme d'une poudre grise granuleuse, de composition suivante en pourcentage de poids (1) :

Substances sèches	90,16
Eau	9,84
Cendres	13,69
Substances solubles dans l'eau	9,35
Azote total	3,42
Matières protéiques correspondantes	21,45

Nous avons chiffré tout d'abord l'activation obtenue en fonction du poids de mycélium sec utilisé. Le graphique n° 5 donne les courbes

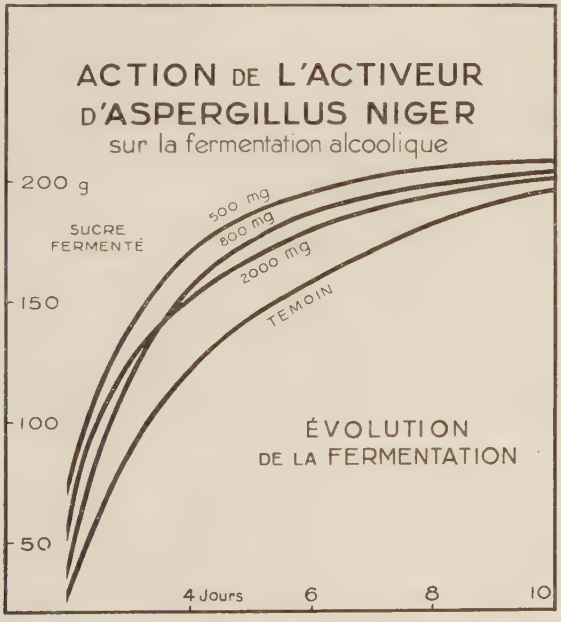


Fig. 5

de fermentation obtenues pour un moût de raisin ayant 210 g de sucre par litre, fermentant à 25°C, à l'abri de l'air, en présence de 0,08, 0,5 et 2 g de produit. 80 mg de mycélium par litre correspondant seulement à

(1) Communiquée par la firme Boehringer Sohn, à Ingelheim.

7,4 mg de substances solubles, assurent par rapport au témoin, une avance de 33 g de sucre fermenté, soit environ 2° Baumé. Pour les additions de 0,5 à 1 g l'écart avec le témoin est plus marqué et atteint une cinquantaine de grammes. Mais 2 g par litre ont seulement un effet comparable à celui de 80 mg. Le graphique n° 6 représente la multiplication des levures dans les mêmes conditions. En fin de fermentation, le nombre total des levures est accru de 45 p. 100 avec l'addition la plus faible, et de 80 p. 100 avec un demi gramme par litre, dose qui produit l'activation optimum.

Non seulement l'activeur d'Aspergillus augmente la population des levures, mais encore il prolonge très nettement leur phase d'activité.

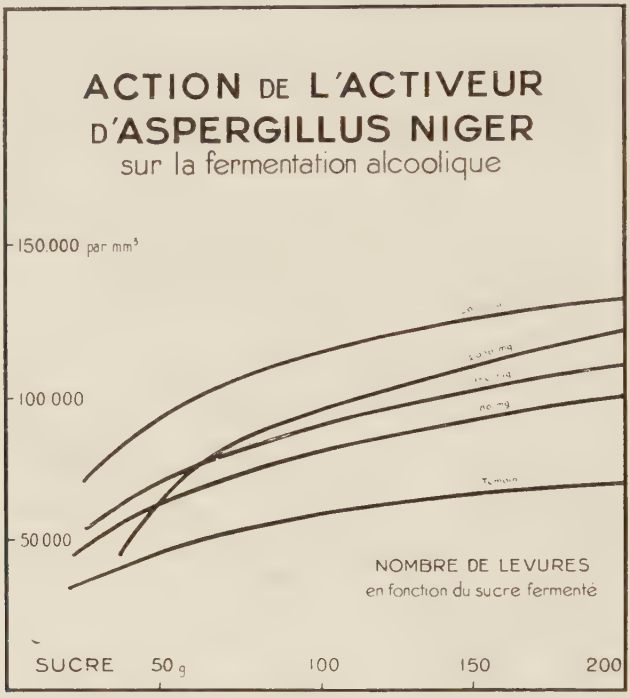


Fig. 6

Un essai effectué sur un moût de 13° Baumé, montre qu'au dixième jour de la fermentation par exemple, le nombre total des levures relevé à l'hématimètre est supérieur de 28 p. 100 à celui du témoin. Mais en réalité, l'écart est beaucoup plus considérable lorsqu'on considère le nombre des cellules vivantes, comptées sur milieu solide. Alors que le témoin n'accuse que 20 000 levures vivantes par mm³, ce chiffre atteint plus du double dans la fermentation activée, soit 44 000 levures. La phase de dégénérescence des levures qui, on l'a vu, est très rapide à l'abri de l'air, est ici retardée de 8 jours, ce qui permet une fermentation plus rapide et plus complète.

L'efficacité de cet activeur est encore accrue dans les moûts botrytisés. De très nombreux essais effectués avec des moûts de raisin prélevés au moment des vendanges dans diverses régions du Bordelais, fermentant spontanément avec les levures du cru, ont montré que,quelle que soit la fermentescibilité originale, celle-ci est toujours améliorée par un apport d'activeur. En outre, dans le cas de mises en refermentation de vins rouges restés accidentellement sucrés, il permet une disparition du sucre plus rapide, sans augmenter notablement du reste la multiplication des levures (66).

Si l'activeur d'*Aspergillus niger* rend possible un meilleur départ

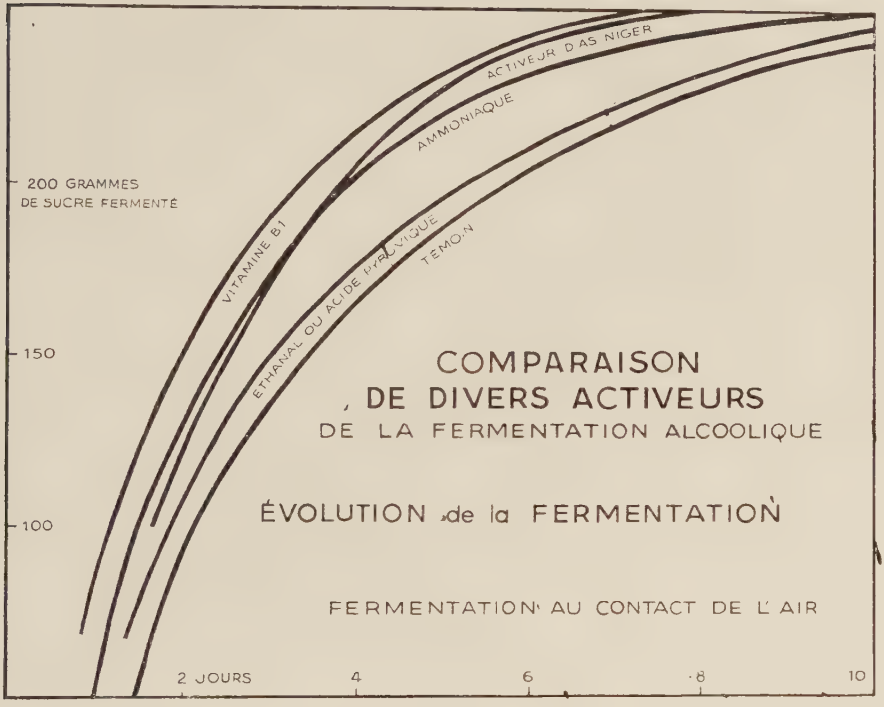


FIG. 7

de la fermentation à basse température, il permet par ailleurs une transformation du sucre plus complète, dans le cas d'une fermentation se déroulant à température trop élevée. C'est ainsi que la fermentation d'un moût de 13° Baumé, s'opérant à l'abri de l'air à une température de 37°C, s'arrête lorsque 9°2 d'alcool sont formés, tandis que dans les mêmes conditions expérimentales, la fermentation se poursuit jusqu'à 10°2, en présence de 0,5 g par litre de poudre de mycélium.

Une étude comparative des divers activeurs étudiés (éthanal et acide pyruvique, sulfate d'ammoniaque, vitamine B_1 et mycélium d'*Asper-*

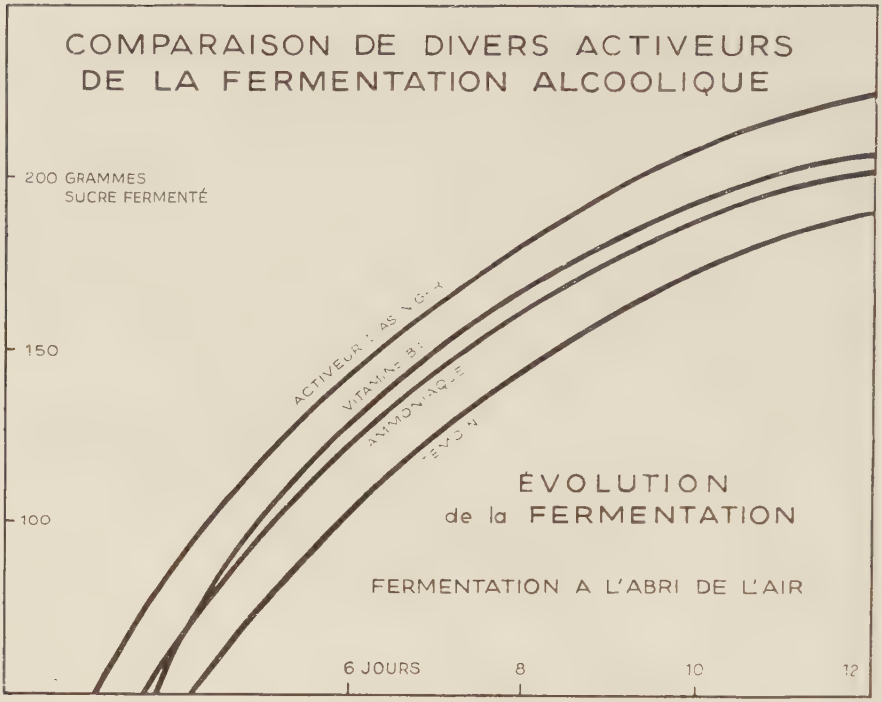

COMPARAISON DE DIVERS ACTIVEURS
DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE
200 GRAMMES
SUCRE FERMENTÉ
150
100
ACTIVEUR DAS N. GER
VITAMINE B1
AMMONIAQUE
TÉMOIN
ÉVOLUTION
de la FERMENTATION
FERMENTATION A L'ABRI DE L'AIR
6 JOURS
8
10
12

FIG. 8

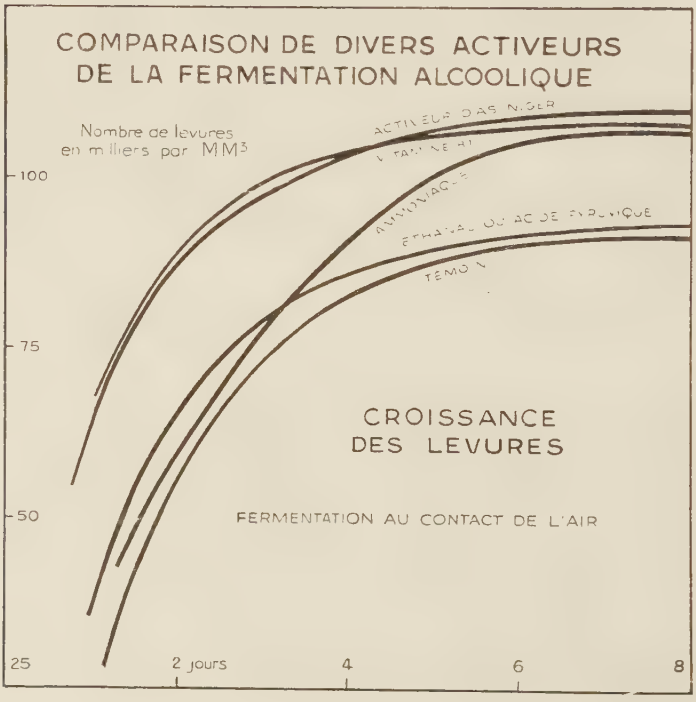

COMPARAISON DE DIVERS ACTIVEURS
DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE
Nombre de levures
en milliers par MM3
100
75
50
25
ACTIVEUR DAS N. GER
VITAMINE B1
AMMONIAQUE
ÉTHANAL OU ACIDE ÉTHYLIQUE
TÉMOIN
CROISSANCE
DES LEVURES
FERMENTATION AU CONTACT DE L'AIR
2 jours
4
6
8

FIG. 9

gillus niger) nous a permis d'établir les courbes des figures 7, 8, 9 et 10. On voit que l'activeur de NIELSEN est celui qui agit le plus fortement tant sur la multiplication des levures que sur l'évolution de la fermentation. Dans un moût de raisin ayant 220 g de sucre par litre et fermentant à 25° à l'abri de l'air, l'addition de 0,5 mg par litre de vitamine B_1 a provoqué par rapport au témoin, une avance de 12 g de sucre fermenté au douzième jour ; l'avance n'est que de 7 g par l'introduction de sulfate d'ammoniaque, mais elle atteint 28 g, soit 1°5, avec 0,5 g de mycélium. En fin de fermentation le sucre restant est de 55 g dans le moût témoin,

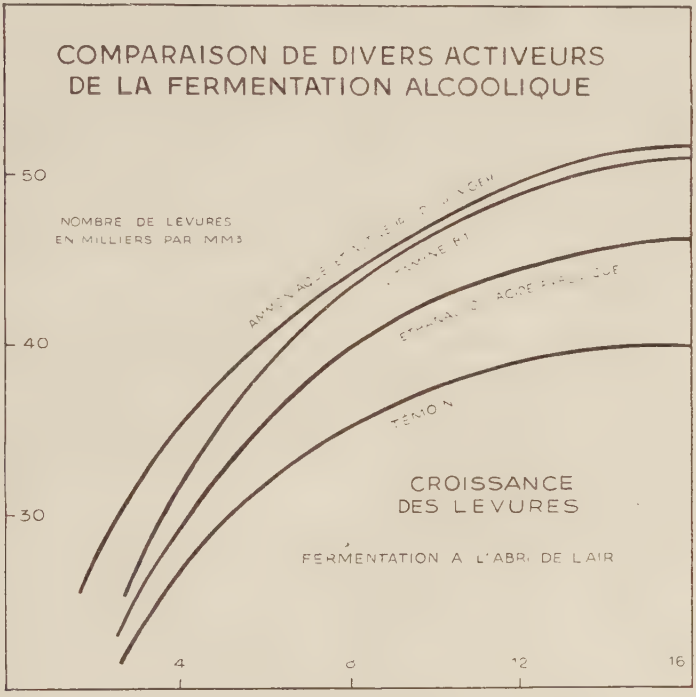


FIG. 10

de 45 g dans les milieux enrichis en vitamine B_1 ou en azote ammoniacal et de 17 g seulement dans le moût activé par le mycélium d'Aspergillus.

Dans une fermentation aérobie par contre, les activeurs précités se comportent sensiblement tous de la même manière, tandis que l'introduction d'éthanal ou d'acide pyruvique joue un rôle activant plus discret.

Par ailleurs, les activations provoquées dans un moût par le mycélium d'*Aspergillus* et par la vitamine B_1 sont additives. Le tableau VIII ci-après en donne un exemple.

TABLEAU VIII

Activations conjuguées par la vitamine B_1 et l'activeur d'Aspergillus

Moût de 250 g de sucre par litre, Fermentation à l'abri de l'air à 25°C.

Sucre fermenté en g par litre. Nombre de levures en milliers par mm³.

		2 jours	4 jours	6 jours
Témoin	Sucre fermenté	12	130	168
	Nombre de levures	*19*	*34*	*45*
+ 0,5 mg vitamine B1	Sucre fermenté	23	179	191
	Nombre de levures	*26*	*47*	*55*
+ 0,5 g de mycélium d'Aspergillus	Sucre fermenté	33	189	221
	Nombre de levures	*27*	*53*	*65*
+ B1 et + mycélium d'Aspergillus	Sucre fermenté	50	209	238
	Nombre de levures	*33*	*70*	*73*

On voit qu'au quatrième jour après l'ensemencement, l'accélération due à la vitamine B_1 est de 49 g, celle due à l'activeur fongique est de 59 g ; l'avance est de 79 g lorsqu'on emploie ensemble les deux activeurs. De même, au sixième jour le nombre des levures est accru de 22 p. 100 avec la vitamine B_1, de 44 p. 100 avec le mycélium d'Aspergillus, et de 62 p. 100 en présence des deux activeurs.

II. — Présence de l'activeur de Nielsen dans les mycéliums de Botrytis et de Pénicilliums

La propriété des mycéliums convenablement traités de constituer des activeurs pour les levures alcooliques, peut être étendue à un certain nombre de moisissures.

Nous avons d'abord observé que les mycéliums des diverses souches de *Botrytis cinerea* Pers., isolées par nos soins ou provenant de la mycothèque de BAARN, étaient capables après lavage, séchage et broyage, d'accélérer la fermentation au même titre que ceux d'*Aspergillus niger*. Dans le but d'étendre ces observations, nous avons cultivé sur moût de bière ou sur moût de raisin, les organismes énumérés dans le tableau suivant. Les mycéliums étaient lavés et séchés. Nous y indiquons l'accélération exprimée en g de sucre, que donne au cinquième jour de la fermentation d'un moût de raisin, l'addition de 0,5 g par litre des divers mycéliums desséchés, et l'augmentation de la population des levures qui en résulte par rapport à un témoin.

	Accélération de la fermentation g de sucre	Augmentation du nombre des levures p. 100
Aspergillus oryzae	58	0
Penicillium urticae	57	0
Penicillium notatum	77	50
Penicillium chrysogenum	54	28
Botrytis cinerea, albino sclerotia	59	32
Botrytis cinerea lini	58	20

Activeurs du Botrytis cinerea. Le *Botrytis cinerea* se cultive facilement à la surface du moût de raisin ou du moût de bière. Les modalités de culture sont exposées en détail dans le chapitre VIII. Après une période de culture d'une quinzaine de jours, le mycélium d'une souche de Botrytis isolé d'un raisin de Sauternes est séparé du milieu. Il est déchiqueté, broyé, lavé plusieurs fois à l'eau distillée bouillie (ce qui a pour effet d'extraire la substance antibiotique qu'il contient et qui sera étudiée au chapitre VIII), et déshydraté par traitement à l'alcool absolu. On sèche ensuite au-dessous de 100°C et on réduit en poudre au mortier.

Ajoutées à la même dose dans un moût sain, cette poudre de Botrytis et la poudre d'Aspergillus, manifestent un pouvoir activant à peu près identique sur la fermentation.

La tableau ci-dessous permet la comparaison des deux produits ajoutés à la même dose de 0,5 g par litre à un moût de raisin ayant 230 g de sucre par litre, fermentant à l'abri de l'air.

TABLEAU IX

Actions comparées de l'activeur du Botrytis cinerea et de l'Aspergillus niger

Moût de 230 g de sucre. Fermentation à l'abri de l'air à 25°.
Sucre fermenté en g par litre. Nombre de levures en milliers par mm³.

		2 jours	4 jours	8 jours	12 jours	Sucre restant après 18 jours
Témoin.....	Sucre fermenté.....	16	83	159	182	38
	Nombre de levures.....	*26*	*31*	*42*	*52*	
Activeur d'Aspergillus.	Sucre fermenté.....	22	117	180	195	16
	Nombre de levures.....	*31*	*43*	*51*	*63*	
Activeur de Botrytis..	Sucre fermenté.....	40	130	180	195	11
	Nombre de levures.....	*32*	*43*	*50*	*62*	

L'effet activant du Botrytis est, au départ de la fermentation, nettement le plus marqué : 2 jours après l'ensemencement, l'avance provoquée par la poudre d'*Aspergillus* est de 6 g par litre ; elle est de 24 g avec la poudre de *Botrytis*. Par la suite, leurs effets sont du même ordre, de même que sur la croissance des levures, mais l'activeur du *Botrytis* a permis en fin de fermentation, la transformation de quelques grammes supplémentaires de sucre.

Des préparations du même genre ont été effectuées avec les mycéliums de deux autres souches de *Botrytis cinerea*, d'origines hollandaise et italienne. Dans un essai, les activations de fermentation provoquées

par des additions de 0,5 g par litre dans un moût de raisin, ont été les suivantes :

	Témoin	+ Mycélium Botrytis cinerea Baarn	+ Mycélium Botrytis cinerea Pérouse
Sucre restant après 3 jours.....	232	182	176
Sucre restant après 6 jours.....	142	12	10
Acide acétique formé (méq)	14,6	12,2	9,2

Le tableau donne encore le taux d'acide acétique formé, plus faible en présence d'activeur que dans le témoin, comme cela s'observe avec l'activeur d'*Aspergillus*.

Il est donc vraisemblable que ces diverses moisissures synthétisent la même substance activante, ou le même groupe de substances, et de plus à des taux très voisins.

III. — Conclusions

Le moût de raisin est un milieu de fermentation dont la composition est très variable d'un cépage à un autre, d'une condition à une autre, d'une année à une autre. Une addition d'azote ammoniacal qui se montre favorable au cours d'une vinification, peut être absolument sans effet l'année suivante, si les conditions de la maturation ont amené une richesse suffisante du moût en cet élément. La même observation est valable pour la vitamine B_1 qui par exemple favorisa la fermentation en 1951 et fut presque sans action en 1953.

Les activeurs d'origine fongique peuvent dans une certaine mesure suppléer à eux seuls à une carence azotée ou vitaminique, mais d'autre part ils favorisent toujours la fermentation alcoolique, quelles que soient la composition du milieu de culture et sa richesse en éléments nutritifs pour les levures. Ils agissent à très faible dose, si l'on considère qu'à peine le dixième de la dose employée est soluble dans l'eau et réellement efficace. Ils ne modifient ni le goût, ni le bouquet du produit fini.

Les conséquences pratiques de ces observations sont importantes, puisqu'il faut admettre que ces produits activants existent dans les raisins pourris (à côté de substances inhibitrices) et qu'ils jouent nécessairement un rôle dans la vinification, dans les régions où la vendange est attaquée par la « pourriture noble ».

D'autre part, l'addition à la vendange de mycéliums de diverses moisissures ayant subi, bien entendu, un traitement spécial pour les désodoriser, les stabiliser et les réduire en poudre, constituerait une pratique favorable à bien des égards pour obtenir chaque année des fermentations plus faciles, plus rapides et plus régulières, donnant des vins d'acidité

volatile moins élevée. Les fabriques d'acide citrique de fermentation, les fabriques d'antibiotiques peuvent livrer de tels activeurs.

A côté des produits utilisés jusqu'à maintenant pour activer et régulariser la fermentation dans la pratique de la vinification, qu'on peut considérer comme des aliments plastiques des levures et, qui ne sont pas toujours opérants, doit s'inscrire une nouvelle catégorie de produits, appelés à un grand avenir, les activeurs vitaminiques : vitamine B_1 et surtout produits d'origine fongique.

Deuxième partie

INHIBITEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Dans une étude d'ensemble sur les substances capables d'arrêter la fermentation alcoolique, L. Genevois, en 1936 (67), considérait trois catégories de produits agissant sur les levures :

1° Les narcotiques, substances généralement liposolubles, qui s'attaquent à toutes les fonctions de la cellule, mais dont l'action est strictement réversible. Après élimination de ces substances, les cellules reprennent la totalité de leur activité. Ce sont des carbures, des alcools supérieurs, simples ou halogénés.

2° Les antiseptiques, capables de tuer la cellule. Dans ce groupe, particulièrement étendu et varié, nous rencontrons les acides benzoïque et salicylique et leurs dérivés, les fluorures, l'acide sulfureux à forte dose et à pH bas, l'isosulfocyanate d'allyle, etc. A faible dose les fluorures rentrent dans le troisième groupe.

3° Les inhibiteurs spécifiques de la fermentation, capables de bloquer les fermentations alcoolique et lactique de la cellule, sans par ailleurs arrêter sa respiration et sa croissance, du moins dans une zone étroite de concentrations. Ce sont les acides α-halogénés, tels l'acide monobromacétique. A plus fortes doses, ces corps entrent simplement dans la catégorie des antiseptiques banaux.

Depuis cette date, on connaît d'autres catégories de produits actifs sur les microorganismes et on peut ajouter à la liste précédente :

4° Certains corps tensioactifs ionisables, à fort pouvoir mouillant et moussant, enrobant les cellules par action de surface, comme les sels d'ammonium quaternaire. Ils sont bactériostatiques et bactéricides, ou fongistatiques et fongicides.

5° Les antivitamines, substances se rapprochant par leur constitution chimique de certaines vitamines ou facteurs de croissance, dont elles sont une réplique que la cellule utilise par ce qu'on pourrait appeler une erreur fatale, car elles bloquent tout métabolisme et entraînent la mort de la cellule. Ce sont des substances comme les sulfamides, antivitamines de l'acide p-aminobenzoïque.

6° Enfin les antibiotiques, substances produites par des moisissures, des actinomyces ou des bactéries, qui se montrent capables d'inhiber la croissance d'autres microorganismes ou de les détruire. Alors que les produits précédemment énumérés agissent en général plus ou moins sur toutes les cellules, les antibiotiques présentent une très grande spécificité dans leur inhibition. Par exemple certains sont actifs contre quelques

catégories de bactéries et d'autres agissent seulement sur certaines espèces de levures.

L'étude de l'action sur les levures de vin de ces substances nouvelles s'imposait et la deuxième partie de notre travail lui est consacrée. De plus, nous avons découvert, en collaboration avec E. PEYNAUD, parmi de nouveaux produits fongicides de synthèse, des substances fortement antiseptiques vis-à-vis des levures, dont il sera également fait état.

Nous étudierons successivement dans le chapitre VI, sous le titre général « Action des antiseptiques sur les levures », l'effet de l'anhydride sulfureux et les modalités de son emploi, les limites d'efficacité dans le moût et dans le vin de certains antiseptiques, l'action des sulfamides et des sels d'ammonium quaternaire.

Chapitre VI

ACTION DES ANTISEPTIQUES SUR LES LEVURES

I. — L'anhydride sulfureux

Le gaz sulfureux est employé depuis des siècles dans la pratique des chais pour la conservation des vins. On connaît ses avantages pour interdire les altérations microbiennes des vins rouges et les refermentations des vins doux. On connaît aussi les inconvénients d'ordres gustatif et hygiénique de son emploi à doses exagérées et on comprend qu'on ait souvent cherché à lui substituer d'autres produits. Cependant on n'a peut-être pas encore suffisamment essayé de préciser les conditions de son application dans les vins doux permettant d'en limiter les doses.

On détermine couramment dans les vins blancs sulfités l'acide sulfureux « libre » et l'acide sulfureux « combiné ». L'acide sulfureux « libre « est l'acide titrable directement par l'iode en milieu acide ; c'est cette teneur qui a une importance pratique, car l'acide sulfureux « libre » est en équilibre avec la concentration en anhydride sulfureux (SO_2) réellement active au point de vue antiseptique qui, suivant l'acidité réelle du vin, est de l'ordre de 1 à 10 p. 100 de l'acide sulfureux « libre ». L'acide sulfureux « combiné » est l'acide sulfureux à l'état de combinaison hydrolysable à froid en milieu alcalin : il n'a par lui-même aucune propriété antiseptique. C'est précisément le grand défaut de l'acide sulfureux de nécessiter, pour maintenir quelques milligrammes par litre de produit actif, la présence de quelques dizaines de milligrammes sous la forme libre et souvent de quelques centaines de milligrammes sous la forme combinée.

L'acide sulfureux combiné est constitué par des combinaisons d'addition à des corps possédant des fonctions aldéhydiques ou cétoniques ; ces corps sont en particulier l'éthanal et les différents sucres. Ces combinaisons se distinguent par leurs stabilités différentes.

La combinaison sulfitique de l'éthanal est assez stable et sa dissociation chimique est pratiquement négligeable. Par contre, l'acide glucose-sulfureux est peu stable et se trouve en équilibre dépendant des conditions de température (68) ; il en est de même de l'acide lévulose-sulfureux. En somme l'acide sulfureux combiné des vins liquoreux comprend deux catégories de combinaisons : l'une stable, définitive, qu'il est, une fois formée, impossible de réduire ; l'autre dissociable, qui suit la valeur de l'acide sulfureux libre du vin, augmente à chaque sulfitage et baisse de manière continue au cours de la conservation, entre deux additions d'anhydride sulfureux.

Pour éviter d'obtenir des teneurs élevées en acide sulfureux combiné dans un vin, il n'y a donc qu'un seul moyen possible : éviter les teneurs élevées du vin en éthanal qui fixe l'acide sulfureux de manière définitive. L'équilibre sucre-acide sulfureux est imposé par les concentrations respectives en présence sur lesquelles on ne peut agir que de façon limitée ; on ne peut descendre, en effet, au-dessous d'une certaine teneur en acide sulfureux libre sans risque de refermentation.

Dans la pratique, il convient donc de rechercher les conditions de vinification et de conservation des vins liquoreux dans lesquelles la formation d'éthanal est minimum.

a) **Influence du sulfitage du moût sur la formation d'éthanal.** — Aux doses légalement admises dans les vins, l'acide sulfureux se conduit comme un antiseptique faible, ou plus exactement comme un narcotique. En effet, en présence des doses habituellement utilisées, si la plus grande partie des levures est tuée, nous verrons qu'il reste toujours suffisamment de cellules vivantes pour déclancher la fermentation lorsque la protection de l'acide sulfureux cesse. La levure réagit contre l'antiseptique. Le mécanisme d'auto-défense mis en jeu par les levures pour neutraliser l'inhibiteur est facile à montrer par les deux expériences suivantes.

On répartit un même moût stérile dans une série de flacons. Chacun d'eux reçoit des doses croissantes d'acide sulfureux allant de 50 à 250 mg par litre. On ensemence ensuite avec un levain d'une culture pure de levures et on laisse incuber à 25°C à l'abri de l'air. Les fermentations se déclarent avec plus ou moins de retard, mais après un temps variant avec l'importance de l'addition d'acide sulfureux, tout le sucre est finalement transformé dans chacun des flacons. On procède alors au dosage de l'éthanal et le tableau X reproduit les résultats de ces analyses.

TABLEAU X

Formation d'éthanal dans des moûts diversement sulfités avant fermentation
Les teneurs sont des mg par litre.

SO_2 ajouté au moût	SO_2 total du vin	SO_2 disparu	Ethanal du vin	Ethanal fixé par SO_2	SO_2 fixé par l'éthanal
0	—	—	24		—
56	32	24	48	24	35
112	79	33	76	52	75
168	118	50	101	77	112
224	150	74	131	107	156

On constate que les quantités d'éthanal produites et les quantités d'acide sulfureux qu'elles fixent augmentent régulièrement et presque

proportionnellement aux doses d'acide sulfureux introduites initialement.

Dans une autre expérience, on mute un jus de raisin de 13° Baumé avec 250 mg de SO_2 par litre au moment où, en pleine fermentation, il titre encore 75 g de sucre et présente 20 mg par litre d'éthanal. On opère cette addition d'une part en présence de toutes les levures, au nombre de 99 000 par mm^3, et d'autre part après les avoir éliminées par centrifugation et filtration. On bouche d'un tampon d'ouate les deux flacons qu'on conserve à la température de 20°C.

Dès l'introduction de l'acide sulfureux, la fermentation est arrêtée dans les deux flacons. Les levures se déposent progressivement au fond du premier. On note leur comportement au cours des 24 heures qui suivent le sulfitage, par numération des cellules vivantes. Une heure après le traitement, ce nombre reste inchangé : les levures ne sont pas affectées par l'acide sulfureux durant la première heure. 5 heures après cependant, la population active se trouve diminuée de 90 p. 100. 24 heures après, pratiquement toutes les cellules ont perdu la faculté de se reproduire, il ne reste que quelques cellules pour mille donnant des colonies. Au contraire, l'hématimètre accuse toujours la même concentration cellulaire totale. Lorsqu'on suit ultérieurement la concentration en éthanal du vin, on constate qu'elle a sensiblement triplé 4 jours après le mutage. Après 11 jours, elle est cinq fois plus forte. Dans le flacon muté en l'absence des levures, la teneur en éthanal est restée inchangée. Les levures continuent donc à réagir contre l'acide sulfureux. Le tableau XI exprime cette évolution, ainsi que l'équilibre SO_2 libre-SO_2 combiné qui en résulte.

TABLEAU XI

Formation d'éthanal dans diverses conditions de mutage
Le mutage a été effectué avec 250 mg de SO_2 par litre.
Teneurs en mg par litre.

	Délai après mutage en jours	SO_2 libre	SO_2 total	SO_2 combiné	Ethanal	SO_2 combiné à l'éthanal
Muté avec toutes les levures (99 000)	4	53	260	207	60	87
	11	33	258	225	103	150
Muté après élimination des levures	4	71	260	189	20	29
	11	67	252	185	20	29

b) **Conditions du mutage.** — En résumé, l'action de l'acide sulfureux sur les levures n'est pas instantanée, comme on aurait pu le supposer.

C'est peu à peu qu'il atteint toutes les cellules à la manière d'un narcotique. Tandis que la transformation du sucre est immédiatement stoppée, vraisemblablement par blocage des enzymes, le taux d'éthanal continue à croître comme si les levures tentaient de bloquer une certaine proportion d'acide sulfureux, pour diminuer les quantités d'antiseptique actif. Les levures sont à l'état de vie ralentie, mais elles ne sont pas mortes. Si le sulfitage n'a pas été suffisant, elles parviennent à déplacer l'équilibre SO_2 libre-SO_2 combiné et il leur faut peu de temps alors pour achever la fermentation interrompue. Pour s'en convaincre, il suffit d'ensemencer un moût stérile avec deux gouttes d'un milieu ainsi muté et qui semble privé de vie : deux jours après, il est le siège d'une active fermentation.

De cet ensemble de faits, nous avons tiré les conclusions suivantes, qui ont été développées ailleurs (69) : Afin de limiter au maximum les teneurs en acide sulfureux total des vins, il convient : 1° de ne pas introduire d'acide sulfureux dans le moût avant la fermentation, ou de limiter le plus possible cette introduction, compte tenu des nécessités d'une vinification saine ; 2° de procéder à l'élimination des levures aussi rapidement et aussi complètement que possible, soit avant mutage, soit peu de temps après l'introduction de l'acide sulfureux ; 3° d'éviter les refermentations, ce qui sera d'autant plus facile à obtenir que les conditions de 1° et 2° auront été mieux réalisées.

II. — Limites d'efficacité de certaines substances antiseptiques

Nous avons étudié dans leur action sur les levures, un grand nombre de substances dont le pouvoir antiseptique était connu. Nous avons chiffré le seuil de leur activité dans le moût de raisin et le vin. A cet effet, nous opérions avec un moût de 200 g de sucre par litre et un vin de 10° d'alcool et 25 g de sucres réducteurs, désulfité au préalable par la quantité juste nécessaire d'éthanal. Le vin et le moût étaient placés à l'étuve à 25°C en flacons incomplètement pleins, après avoir été ensemencés par un levain en activité. Nous rassemblons dans le tableau XII, les résultats obtenus pour un certain nombre de produits.

L'azothydrate de sodium, l'isosulfocyanate d'allyle, l'acide monobromacétique, l'hydroxyquinoléine, le p-chlorobenzoate de sodium, ont provoqué des inhibitions totales. Cependant ces produits sont ou toxiques, ou doués d'odeur désagréable, ou bien actifs seulement à des concentrations très élevées de l'ordre de 1/10 000, tandis que les antibiotiques antifongiques étudiés au chapitre VII nous donneront des exemples de corps actifs, au 1/1 000 000 et même au 1/10 000 000.

La vitamine K_5 (chlorhydrate de 2-méthyl 4-amino 1-naphtol), incapable d'empêcher complètement la fermentation d'un moût de raisin, peut assurer une bonne protection des vins sucrés. L'absence

TABLEAU XII

Liste des antiseptiques essayés et limites d'activités

Noms des produits	Propriétés	Action sur la fermentation
Acide caféique		50 mg par l retardent de quelques heures la fermentation du moût de raisin.
Acide déhydroacétique (70)	Antifongique.	50 mg par l retardent de 48 h le départ de la fermentation, mais elle se termine normalement.
Acide férulique		Aucune action sur les levures.
Acide monobromacétique (71)	Antiseptique.	La fermentation du moût est inhibée par 20 mg par l, celle du vin par 10 mg.
Azothydrate de sodium (72)	Antiseptique.	La fermentation du moût est inhibée par 5 mg par l.
Bromacétate d'éthylglycol (71)	Antiseptique.	La fermentation du moût est inhibée par 50 mg par l, celle du vin par 20 mg.
Chloramine T	Oxydant.	Sans action à la dose de 50 mg par l.
Eau oxygénée	Oxydant.	Employée en cours de fermentation, légère action retardatrice.
Hydroxyquinoléine (Bisulfite ou sulfate)	Antiseptique, fongicide.	20 mg par l retardent de 5 jours le départ de la fermentation ; 50 mg l'inhibent.
Ions Ag (73)	Antiseptique.	Ne peuvent empêcher complètement la fermentation d'un moût ou d'un vin, mais les rendent moins fermentescibles.
Isosulfocyanate d'allyle (74)	Antiseptique.	10 mg par l inhibent la fermentation du moût ; 2 mg interdisent la fermentation d'un vin.
Paraoxybenzoate de Na.	Antiseptique.	500 mg par l n'empêchent pas la fermentation du moût et ne suffisent pas à stabiliser le vin.
Parachlorobenzoate de Na	Antiseptique.	100 mg par l inhibent la fermentation du moût et 50 mg celle du vin.
Réductone (75)	Réducteur.	A la dose de 50 mg par l retarde de quelques heures la fermentation du moût.
Uracile (76)		Aucun effet sur la fermentation du moût.
Vitamine K5 (77)	Fongicide.	Retarde considérablement le départ de la fermentation du moût (20 mg par l d'une huitaine de jours) : 10 à 15 mg empêchent la fermentation du vin.

complète de toxicité de la vitamine K_5 lui a permis d'être proposée à titre de conservateur des aliments et des boissons. Ajoutons que 5 mg par litre empêchent radicalement le développement des bactéries acétiques et l'acétification du vin.

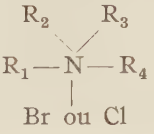
III. — Essai des sulfamides sur les levures

Nous avons essayé de nombreuses sulfamides dans leur action sur les levures de vin : acide p-aminosalicylique, sulfanilamide, sulfanylthiourée, sulfathiazol, sulfamérazine, sulfadiazine, p-aminophénylsulfonylguanidine, sulfapyridine, etc. Certains de ces produits retardent un peu la fermentation, mais aucun ne manifeste une action inhibitrice digne d'intérêt. Cela se conçoit très bien après l'étude des facteurs de croissance des levures. On sait que les sulfamides agissent comme antivitamines de l'acide p-aminobenzoïque. Or ce facteur de croissance n'ayant

montré aucune influence accélératrice sur la multiplication des levures de vin, il est logique que les sulfamides ne possèdent aucune action inhibitrice sur ces mêmes levures.

IV. — Essai des sels d'ammonium quaternaire

Les sels d'ammonium quaternaire sont des produits azotés synthétisés à partir du chlorure d'ammonium en substituant à un atome d'hydrogène de la molécule un radical organique. La formule générale est la suivante :



Lorsque deux au moins de ces radicaux comportent une longue chaîne carbonée ou un cycle, surtout s'ils sont non saturés, la substance possède des propriétés antiseptiques. Le nombre des sels d'ammonium quaternaire est maintenant considérable. Solubles dans l'eau, les alcools et autres solvants, d'un pouvoir mouillant très élevé, ils sont relativement stables vis-à-vis des agents chimiques et de la chaleur. Toutefois, ils sont incompatibles avec la plupart des matières organiques. Les protéines par exemple, peuvent neutraliser leur action en formant avec eux des combinaisons complexes. Aux doses normales d'emploi, en général faibles, leur toxicité est nulle. Leur désavantage est de faire mousser fortement les liquides qui les contiennent même en très faible proportion.

a) **Expérimentation des sels d'ammonium quaternaire sur la fermentation.** — Nous avons essayé l'action sur les levures d'un certain nombre de sels d'ammonium quaternaire. Nous les donnons dès maintenant par ordre décroissant d'activité :

1. — Bromure de décyldiméthylammonium.
2. — Bromure de lauryldiméthylbenzylammonium.
3. — Bromure de triméthylalkylammonium.
4. — Chlorure d'alcoyldiméthylbenzylammonium.
5. — Chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium.
6. — Bromure de cétyltriméthylammonium.
7. — Chlorure de cétyldiméthylbenzylammonium.
8. — Bromure de cétyldiméthylcyclohexanolammonium.
9. — Chlorure de lauryldiéthylbenzylammonium.

Les fermentations ont été conduites avec une levure elliptique et avec une *Kloeckera apiculata*. La marche des fermentations est suivie

par dosage du sucre et numération des levures. Les résultats sont exposés dans les tableaux XIII et XIV.

De ces essais, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Tous les sels d'ammonium quaternaire agissent sur les levures et retardent la fermentation sans pouvoir, même à dose forte, l'inhiber complètement dans le moût de raisin. Ils ne réussissent qu'à prolonger la phase de latence. La diminution du nombre de cellules de levures est inférieure à 35 p. 100.

TABLEAU XIII

Action du bromure de décyldiméthylammonium sur Saccharomyces ellipsoïdeus et Kloeckera apiculata

Moût de 200 g de sucre fermentant à 25° à l'abri de l'air.

Sucre fermenté en grammes, nombre de levures en milliers par mm³.

			4 jours	8 jours	11 jours	16 jours
Saccharomyces ellipsoïdeus	Témoin	Sucre fermenté	34	92	165	195
		Nombre de levures	*38*	*42*	*46*	
	+ 10 mg	Sucre fermenté	15	65	129	193
		Nombre de levures	*5*	*35*	*39*	*43*
	+ 20 mg	Sucre fermenté		15	89	191
		Nombre de levures		*13*	*33*	*44*
	+ 50 mg	Sucre fermenté			75	177
		Nombre de levures			*21*	*39*
	+ 100 mg	Sucre fermenté			81	186
		Nombre de levures			*21*	*35*
Kloeckera apiculata.	Témoin	Sucre fermenté	41	80	95	95
		Nombre de levures	*11*	*23*	*24*	
	+ 10 mg	Sucre fermenté	41	62	66	66
		Nombre de levures	*12*	*13*	*14*	
	+ 20 mg	Sucre fermenté	27	47	58	62
		Nombre de levures	*4*	*7*	*10*	

Si l'on prend l'exemple du produit n° 1, le plus efficace, on voit qu'au treizième jour d'une fermentation anaérobie, le retard par rapport au témoin est de 27 g de sucre avec 10 mg par litre de produit, de 30 g avec 20 mg et de 125 g avec 50 et 100 mg.

L'addition de 100 mg par litre retarde de 10 jours environ le départ de la fermentation. Le nombre total de levures déterminé un mois après l'ensemencement, lorsque le sucre est complètement transformé, est diminué par rapport au témoin respectivement de 6 p. 100 pour les deux premières doses et 12 et 21 p. 100 pour les deux autres.

Cependant, les levures apiculées sont plus sensibles que les levures elliptiques. En fin de fermentation avec 20 mg par litre du produit n° 1 il reste dans le milieu 33 g de sucre non transformé par ces levures, de plus que dans le témoin et le nombre de levures apiculées est diminué de 58 p. 100.

Tableau XIV

Influence de divers sels d'ammonium quaternaire sur la fermentation alcoolique

Sur moût de raisin de 200 g de sucre.

	Départ de la fermentation au $n^{ème}$ jour	Durée de la fermentation en jours	Population finale en milliers par mm^3
Témoin	2	13	46
Bromure de décyldiméthylammonium			
10 mg	5	13	43
20 mg	7	13	44
50 mg	10	20	39
100 mg	10	20	35
Bromure de lauryldiméthylbenzylammonium			
10 mg	5	17	45
20 mg	5	17	40
Bromure de triméthylalkylammonium			
10 mg	5	17	44
20 mg	5	17	40
Chlorure d'alcoyldiméthylbenzylammonium			
10 mg	5	17	40
20 mg	5	17	41
50 mg	7	20	39
100 mg	8	30	37
Chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium			
10 mg	5	13	44
20 mg	5	19	43
50 mg	7	30	39
100 mg	7	30	38
Bromure de cétyltriméthylammonium			
10 mg	4	10	42
20 mg	5	12	40
Chlorure de diméthylbenzylammonium			
10 mg	4	10	43
20 mg	5	13	43
Bromure de triméthylalkylammonium			
10 mg	4	12	37
20 mg	5	14	37
Bromure de cétyldiméthylcyclohexanolammonium			
10 mg	4	9	45
20 mg	4	9	40
Chlorure de lauryldiéthylbenzylammonium			
10 mg	5	17	42
20 mg	7	30	40
50 mg	7	30	39
100 mg	7	>30	38

2° Le pouvoir inhibiteur développé n'est pas proportionnel à la dose de produit introduite : 100 mg par litre n'ont parfois pas plus d'effet sur les levures elliptiques que 10 mg. Au dixième jour d'une fermentation par exemple, les retards par rapport au témoin sont respectivement de 71 g, 71 g, 100 g et 113 g de sucre par litre pour des doses de 10, 20, 50 et 100 mg de produit n° 1.

3° Par comparaison entre les produits n° 2 et n° 9 on peut conclure que dans la molécule d'un sel d'ammonium quaternaire, le groupe diéthyl est beaucoup moins actif que le groupe diméthyl. De même, en comparant les produits n° 3 et 4 et 7 et 8, on voit que le remplacement d'un groupe méthyl par un groupe benzyl s'accompagne de la perte d'une certaine activité, de même que le remplacement du groupe benzyl par un groupe cyclohexanol.

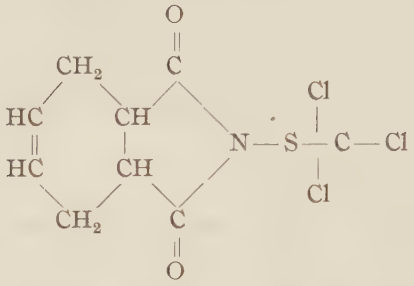
b) **Mode d'action des sels d'ammonium quaternaire.** — Le mode d'action de ces produits a été discuté. On peut penser qu'en vertu de leurs propriétés tensioactives, ils exercent sur la levure une action de surface. Ceci permettrait d'expliquer le fait de la non-proportionnalité de leur action en fonction de la dose utilisée. Ils opèrent davantage comme fongistatiques que comme fongicides vis-à-vis des levures. Celles-ci parviennent, après une période plus ou moins prolongée, à neutraliser totalement l'inhibition. Vraisemblablement l'action des sels d'ammonium quaternaire est gênée dans le moût par les protéines. Quoiqu'il en soit, le pouvoir antiseptique des sels d'ammonium quaternaire, très fort sur d'autres microorganismes tels que les bactéries acétiques, est relativement peu marqué sur les levures de vins. On ne peut songer à les utiliser pour le mutage ou la conservation des vins doux.

V. — Découverte de produits très actifs sur les levures parmi les antifongiques de synthèse

La recherche systématique de l'action sur les levures d'un grand nombre de substances, nous a mis sur la voie de produits qui se sont montrés particulièrement efficaces et qui finalement peuvent se classer parmi les inhibiteurs les plus puissants de la fermentation alcoolique. Ces produits appartiennent au groupe des antifongiques de synthèse, utilisés pour les traitements anticryptogamiques des arbres fruitiers et de la vigne. Ce sont les 2,3-dichloro 1,4-naphtaquinone et la trichlorométhylthiotétrahydrophtalimide (78). Ces deux substances agissent à peu près aux mêmes doses, mais la seconde semble dans le moût et le vin d'une stabilité un peu meilleure. 7 à 8 mg par litre interdisent la fermentation du moût de raisin pendant un délai assez long (fig. 11), 30 à 50 mg par litre sont capables d'arrêter une fermentation en pleine activité, enfin des doses de l'ordre du milligramme ou même, suivant les levures, inférieures à cette concentration, empêchent la refermentation du vin pendant un mois et 5 mg pendant plusieurs mois.

Notre étude portera ici surtout sur la trichlorométhylthiotétra-

hydrophtalimide, commercialisée sous le nom de S.R. 406 ou « Captane ». Sa formule est la suivante :



Le produit commercial contient 50 p. 100 de produit pur, additionné d'une charge de kaolin et d'un mouillant qui assure une suspension homogène, la substance pure étant peu soluble. Les doses que nous indiquons dans nos essais sont les doses de produit commercial ; elles correspondent donc au double des doses réellement efficaces.

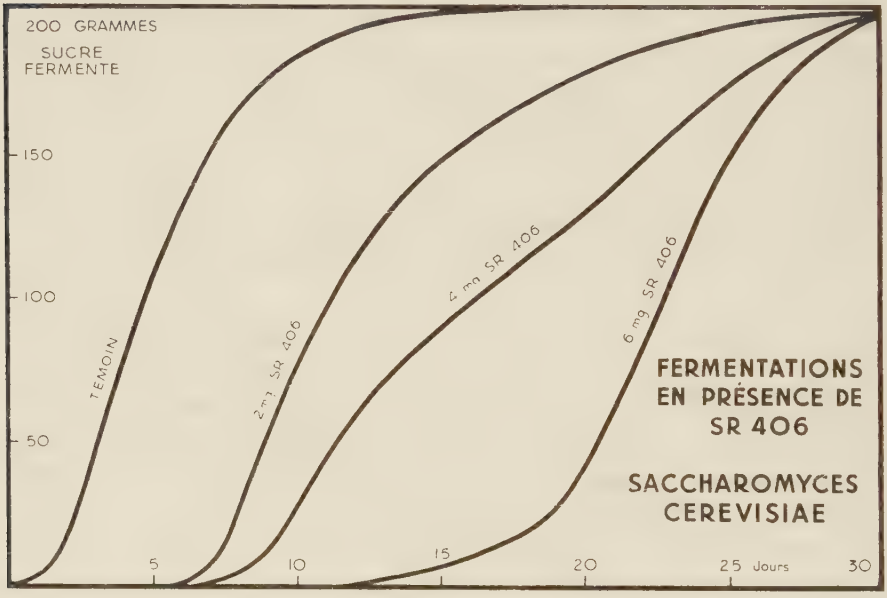


Fig. 11

Nous nous sommes attachés d'abord à établir les seuils exacts d'activité en fonction de la race de levure et de la nature du milieu. Dans le jus de raisin, les diverses souches de levures présentent des sensibilités variables au captane : 2 mg par litre suffisent pour inhiber totalement *Saccharomyces ellipsoïdeus* nº 41, tandis que 8 mg sont nécessaires pour empêcher *Saccharomyces ellipsoïdeus* nº 51 de fermenter. L'inhibition

totale des *Kloeckeras* exige des doses voisines de 5 mg par litre Les levures du genre *Hansenula*, fortement oxydatives, résistent à des concentrations de 20 mg par litre, tandis que les *Torulopsis* ne peuvent fermenter en présence de 2 mg par litre. La dose de captane nécessaire à la stabilisation d'un moût naturel contenant en général de nombreuses races de levures, ne peut donc être fixée d'une manière exacte.

Dans un vin de 10° d'alcool et titrant 25 g de sucres réducteurs, ensemencé avec des levures elliptiques, les quantités minima de captane interdisant la refermentation varient suivant les souches de 0,2 à 0,5 mg par litre, tant qu'on ne prolonge pas l'expérience plus d'un mois et qu'on ne renouvelle pas l'ensemencement. En effet, le produit manque de stabilité lorsqu'il est ajouté au vin et il perd progressivement son efficacité.

Dans le vin, le produit est en partie détruit par un chauffage ; il est oxydable au contact de l'air, il est sensible à la lumière, ainsi que l'ont montré des essais de stabilité sur bandelettes de papier-filtre (79). Il se combine à l'éthanal avec une perte de son pouvoir antiseptique.

Le gaz sulfureux, par contre, provoque la réaction inverse. Il tend à stabiliser le produit et augmente nettement son action inhibitrice. La combinaison, vraisemblablement une réaction d'addition est immédiate ; elle s'extériorise par une augmentation de l'odeur de mercaptan du produit. 50 mg d'acide sulfureux par litre donnent très peu d'odeur à de l'eau distillée, de même que 20 mg de captane, mais si l'on ajoute simultanément les deux produits, l'odeur dégagée est très forte.

D'autre part, ajouté à la dose de 0,5 mg par litre à des vins doux ensemencés avec *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 51, sous la forme de suspension dans une solution de bisulfite ou de gaz sulfureux, la fermentation a été interdite pendant 6 mois et sans doute l'était-elle définitivement. Cependant, les quantités de SO_2 ainsi introduites étaient négligeables et ne dépassaient pas 10 mg par litre.

Le produit n'est pas toxique : la toxicité aiguë par ingestion dépasse 15 g par kg. L'inconvénient de ce produit est qu'il n'est pas facilement dosable aux doses d'emploi ; une méthode colorimétrique a été donnée (80).

L'action du captane sur les levures a été, de même, signalée par Roubert (81) et récemment étudiée par Cordonnier (82), qui insistent sur la faible stabilité du produit.

VI. — Conclusions

Le gaz sulfureux, même employé rationnellement dans la pratique de la vinification et de la conservation des vins, ne peut être considéré comme l'antiseptique idéal. Aux plus fortes doses tolérées, il ne peut

empêcher la fermentation que momentanément. Ses affinités chimiques pour les fonctions aldéhyde et cétone, font qu'il est neutralisé dans le vin par un grand nombre de substances d'où, pour maintenir une dose active très faible, obligation d'utiliser des quantités 10 à 20 fois plus fortes.

D'autre part, parmi les antiseptiques classiques, nous trouvons des produits très actifs, stables, mais toxiques. Les sels d'ammonium quaternaire se classent parmi les inhibiteurs faibles.

La trichlorométhylthiotétrahydrophtalimide agit fortement à des concentrations peu élevées. Sa compatibilité avec l'anhydride sulfureux, son manque de toxicité pourraient en faire un bon stabilisateur des vins doux, toutes questions de réglementation mises à part, s'il était possible par ailleurs de confirmer sa stabilité, souvent insuffisante, et de contrôler sa dose d'emploi par un dosage facile.

Chapitre VII

ACTION DES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES SUR LES LEVURES

Depuis la découverte des premiers antibiotiques (pénicilline, streptomycine, chloromycétine), une prospection systématique a été entreprise concernant les produits de la sécrétion de toutes les moisissures connues, identifiées ou non. A ce jour, le nombre des antibiotiques isolés est tel que récemment, par exemple, faisant la revue des antibiotiques dûs aux seuls actinomycètes, Benedict (83) a rédigé un véritable dictionnaire où ces substances sont classées par ordre alphabétique. A leur début, les recherches étaient dirigées dans le but de lutter contre les microorganismes pathogènes, en vue d'applications thérapeutiques. Les activités technologiques peuvent également tirer bénéfice de ces découvertes. Ainsi, parmi les premiers antibiotiques antifongiques isolés pour combattre les champignons pathogènes, certains peuvent trouver une utilisation dans les industries alimentaires ou les industries de fermentation.

Nous passons en revue dans ce chapitre, les nombreuses observations signalant un antagonisme entre levures et autres microorganismes, et nous donnons un compte-rendu des recherches que nous avons nous-mêmes entreprises, sur l'action des antibiotiques sur les levures.

I. — Isoantagonisme

Si la découverte des antibiotiques est récente, des phénomènes d'antibiose et d'antagonisme avaient été observés depuis longtemps. On relève de nombreuses observations se rapportant aux levures.

Dès 1900, Lebedeff (84) signale la formation par les levures de substances toxiques pour leurs propres cellules. En 1909, Hayduck montre, dans des essais repris un peu plus tard par Fernbach (85), qu'en laissant macérer pendant quelques heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 g par litre, de la levure de boulangerie séchée au préalable à 37°, on obtient un liquide antiseptique pour les levures ; il détruit rapidement *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* et lyse en peu de temps *Bacterium coli* et les staphylocoques. Cette substance passe à travers les filtres, est entraînée par la vapeur d'eau lorsqu'on distille à basse pression à température inférieure à 40°, mais ne résiste pas à un chauffage à 100° C. Fernbach note d'ailleurs que les propriétés bactéricides de la levure sont connues depuis longtemps et utilisées empiriquement en thérapeutique.

L'isoantagonisme des levures est un fait bien acquis dans la pratique des fermentations. D'après Lebedeff, déjà cité, lorsque les conditions expérimentales sont défavorables et particulièrement lorsque l'aération est insuffisante et la température trop élevée, la levure sécrète des produits qui inhibent son propre développement. Boulard (86) observe à nouveau le phénomène et propose même « un procédé permettant d'arrêter à volonté les fermentations à n'importe quel moment » au moyen de chauffages et d'ensemencements successifs. D'une façon analogue, Malvezin (87) aurait obtenu un « vaccin biologique » susceptible de préserver les vins de toute refermentation.

Pour Ferré (88), les difficultés et accidents de fermentation seraient dûs simplement à un degré alcoolique trop élevé et l'auteur conteste dans ces cas l'intervention d'une production de toxine ou même d'une carence vitaminique.

Cependant, Ribéreau-Gayon et ses collaborateurs (89) ont montré que la refermentation d'un milieu dépend pour beaucoup des conditions dans lesquelles s'est développée la première fermentation. Lorsque celle-ci s'est effectuée en anaérobiose totale ou en présence d'une teneur en sucre trop élevée, la croissance des levures dans le milieu est très difficile. On a pu constater d'autre part que certaines levures dextrogyres de Sauternes empêchent le développement d'autres levures dans les milieux qu'elles ont fermentés partiellement. En outre, tous ceux qui ont utilisé l'eau de levure comme milieu de culture savent que, si la dilution n'est pas suffisante, le milieu est moins fermentescible.

II. — Antagonisme levures-bactéries et levures-champignons

L'antagonisme des levures s'exerce aussi sur d'autres organismes. D'après Schiller, des levures cultivées en milieu dépourvu d'azote, acquièrent des propriétés lytiques. Wasksman (90) cite les cas d'une *Torulaspora utilis* qui inhibe diverses bactéries gram-négatives et d'une *Rhodotorula* qui élabore une substance thermostable antagoniste d'*Aspergillus niger* et à un degré moindre d'*Aspergillus oryzae*. Cook (91) et ses collaborateurs ont isolé des cellules de levures, une substance active contre les moisissures et les bactéries. De même Seigneurin et ses collaborateurs (92) ont extrait de la levure de bière et des bactéries acétiques des substances cristallisées qui inhibent les bactéries gram-positives et gram-négatives.

Des observations extrêmement importantes pour la pratique de la brasserie ont été faites récemment par Koch et Clement (93). Le pouvoir antibiotique de 145 souches de levures de bière, de vin, de distillerie et de boulangerie, a été examiné par la méthode des zones d'inhibition sur

plaques nutritives, vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, de *Bacterium prodigiosium* et des pédiocoques responsables des troubles de la bière. Toutes les races de levures de bière, hautes et basses, et toutes levures de distillerie et de boulangerie à une exception près, inhibent plus ou moins le développement de ces microorganismes, certaines avec une grande intensité. Par contre, les levures de vin se montrent peu actives à ce point de vue. L'effet d'antibiose a été de même constaté en milieu liquide et le filtrat stérile de levures actives est efficace. Le chauffage à 100°C détruit les substances actives.

III. — Microorganismes producteurs de substances antifongiques et antilevures

Inversement, nombreux sont les champignons et bactéries doués d'un pouvoir anti-levure. D'après Kopaczewski (94), *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus anthracis* seraient antagonistes de *Saccharomyces cerevisiae*. D'après Waksman, il en serait de même de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de *Saccharomyces ellipsoïdeus* et *Saccharomyces pastorianus*. L'acide aspergillique sécrété par plusieurs souches de *Penicillium* et par *Aspergillus ochraceus*, se montre légèrement actif contre les levures, de même que la tyrothricine et la patuline dont l'une est due à *Bacillus brevis*, l'autre à *Penicillium patulatum*. Sobels (95) cite l'action antibiotique de quelques myxomycètes sur *Saccharomyces cerevisiae*. Les travaux de Muller-Thurgau (96) repris par Michel (97) et par Schanderl (98), portant sur l'antagonisme d'*Aspergillus niger*, de *Penicillium glaucum* et de *Botrytis cinerea* vis-à-vis des levures, ont servi de base à notre étude sur la formation par *Botrytis cinerea* de substances anti-levures dans les jus de raisins « pourris noble » (chapitre VIII). C'est parmi les *Streptomyces* surtout que l'on trouve le plus grand nombre de producteurs d'antibiotiques antifongiques susceptibles d'inhiber les levures. 56 p. 100 des souches de Streptomyces ont des propriétés antifongiques, d'après Alexopoulos (99). En 1951 au Japon, Kasuyoshi Aiso (100) avait caractérisé parmi 400 souches d'actinomyces, 240 ayant des propriétés antifongiques ou antilevures susceptibles d'applications dans les industries alimentaires.

Waksman (101) a classé en trois groupes les antibiotiques d'après leur spectre antimicrobien :

1° Les antibiotiques capables d'agir plus ou moins fortement sur la croissance des bactéries, des levures et des champignons, tels la gliotoxine, la patuline, l'actinomycine, la tyrothricine, la streptothricine, etc.

2° Les antibiotiques actifs sur quelques bactéries et sur les actinomyces, mais inactifs sur les champignons et les levures, tels la pénicilline, la streptomycine, le chloramphénicol, l'auréomycine, la terramycine, etc...

3° Les antibiotiques actifs sur les champignons et quelques levures, et peu ou pas actifs sur les bactéries, tels l'actidione, l'antimycine, la mycosubtiline, la fradicine, etc.

IV. — Action des antibiotiques des premier et deuxième groupes

Nous avons étudié (102) l'action sur la fermentation alcoolique du moût de raisin ensemencé de levures en culture pure, d'un certain nombre d'antibiotiques appartenant à chacune des trois classes. Seuls ceux du troisième groupe ont été réellement efficaces. Mais étant donné l'étendue du spectre antimicrobien de chaque antibiotique, il était intéressant d'examiner l'action, sur les levures de vin, des antibiotiques des autres groupes.

Le protocole des essais reste le même que précédemment. On estime le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique à étudier en comparant la marche de la fermentation du jus de raisin en sa présence, à celle de la fermentation du même moût témoin, par dosage du sucre et numération des levures. Les essais sont menés à la température de 25°C, dans les deux conditions habituelles d'aération.

Nous avons étudié les antibiotiques suivants ; nous indiquons l'agent producteur de l'antibiotique.

Premier groupe

Tyrothricine	*Bacillus brevis*
Patuline	*Penicillium patulatum*
Actinomycine	*Streptomyces antibioticus*
Notatine	*Penicillium notatum*

Deuxième groupe

Pénicilline G	*Penicillium notatum*
Auréomycine (chlorhydrate)	*Streptomyces aureofaciens*
Didromycine (sulfate de déhydrostreptomycine)	*Streptomyces griseus*
Chloramphénicol (chloromycétine)	Produit de synthèse
Subtiline	*Bacillus subtilis*
Bacitracine	*Bacillus subtilis*
Néomycine	*Streptomyces fradiae*
Terramycine	*Streptomyces rimosus*
Baccatine (103)	*Gilberella baccata*
Acide kojique	*Aspergillus oryzae*

On trouvera ailleurs le détail des résultats expérimentaux (102).

Ajoutés aux doses de 10, 20, 50 et 100 mg par litre, quelles que soient

les conditions d'aération, la pénicilline, l'auréomycine, la didromycine, le chloramphénicol, la bacitracine, la néomycine, la terramycine, la baccatine, l'acide kojique ne modifient pas notablement la vitesse de la fermentation. Toutefois, à la concentration de 50 mg par litre, ces antibiotiques diminuent sensiblement la population levurienne totale. Celle-ci est diminuée de 10 p. 100 par la pénicilline, 20 p. 100 par l'auréomycine et la néomycine, et 32 p. 100 par la didromycine. Le chloramphénicol à l'abri de l'air abaisse de 40 p. 100 le nombre des levures.

La patuline à la dose de 100 mg par litre retarde de un à deux jours le départ de la fermentation et diminue de 35 p. 100 la population de levures. La tyrothricine, à 50 mg par litre, parvient au sixième jour de la fermentation à retarder celle-ci de 44 g de sucre à l'air et de 71 g à l'abri de l'air. Elle réduit en outre de moitié le nombre final de levures. Elle se distingue de la plupart des antibiotiques faibles, capables seulement de freiner la fermentation dans ses premières phases par le fait que son action se manifeste surtout, non dans les débuts, mais dans le cours de la fermentation. L'actinomycine (ou soframycine) se montre moins active que la tyrothricine sur la fermentation, mais aussi efficace sur la croissance cellulaire. La notatine est pratiquement inopérante. Toutes ces substances, plus antibactériennes qu'antifongiques, n'exercent sur les levures de vin une action inhibitrice sensible qu'à des doses trop considérables pour qu'elles puissent faire l'objet d'applications technologiques.

V. — Action des antibiotiques du troisième groupe

Le tableau XV rassemble une liste des antibiotiques connus pour leurs propriétés antifongiques.

Parmi les antibiotiques antifongiques qu'il nous a été possible d'étudier, nous nous étendrons plus particulièrement sur l'actidione, la mycosubtiline, l'antimycine A, la candicidine et deux antibiotiques anglais : A 228 et A 432.

a) **Actidione.** — C'est un sous-produit de la fabrication de la streptomycine, dû à *Streptomyces griseus*. Whiffen et Bohonos (104) observant que le bouillon de culture de cet organisme inhibait le champignon pathogène *Cryptococcus neoformans*, contrairement à la streptomycine, pensèrent qu'il contenait un deuxième antibiotique. Par extraction au chloroforme et purification, ils obtinrent une substance cristallisée que ses propriétés chimiques et son spectre antibiotique distinguent nettement de la streptomycine.

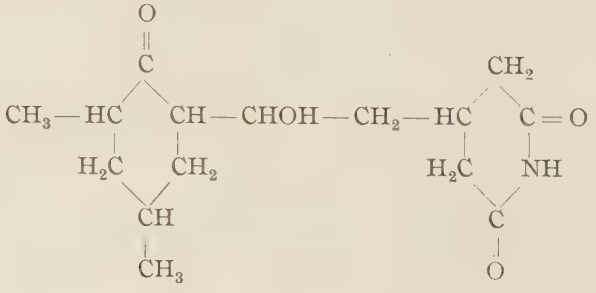
L'actidione est soluble par vive agitation dans l'eau (2 p. 100), très soluble dans le chloroforme, l'alcool et l'éther. Les solutions aqueuses se conservent pendant plusieurs semaines à la glacière à des pH compris

Tableau XV

Documentation sur quelques antibiotiques antifongiques

Désignation de l'antibiotique	Microorganisme producteur	Auteurs
Abikoviromycine	*S. rubescens* et *S. abikoensum.*	Umezawa, 1951 (83).
Actidione	*Streptomyces griseus.*	Whiffen, Bohonos et Emerson, 1946 (104).
Actinomycine	*Streptomyces antibioticus.*	Waksman et Woodruff, 1940 (83).
Actinone	*Streptomyces sp.*	Ikeda, 1950 (83).
Acide alternarique	*Alternaria solani.*	Brian et coll., 1951 (105).
Antibiotique 136	*Streptomyces lavendulae.*	Bohonos et coll., 1947 (83).
Antibiotique n° 1050	Champignon n° 1050 (Station Centrale Pathologie Végétale, Versailles).	Flanzy et Dupuy, 1952 (106).
Antimycine A	*Streptomyces sp.*	Strong et coll., 1949 (107).
Ascosine	*Streptomyces canescus.*	Hickey et coll., 1952 (108).
Cardicine	*Nocardia.*	Machlowitz, 1952 (83).
Candicidine	*Streptomyces sp.*	Waksman et coll., 1952 (109).
C. 381 et C. 135	*Streptomyces sp.*	Waksman et coll., 1952 (95).
Endomycine	*Streptomyces endus.*	Gottlieb, 1950 (110).
Flavacide	*Streptomyces voisin de S. glavus.*	Takahashi, 1952 (83).
Fradicine	*Streptomyces fradiae.*	Swart, Romano et Waksman, 1950 (111).
Fungicidine	*Streptomyces sp.*	Hazen et Brown, 1951 (112).
Gliotoxine	*Trichoderma viride.*	Brian, 1944 (113).
Glutinosine	*Metarrhizium glutinosum.*	Brian et coll., 1947 (114).
Griseofulvine	*Penicillium janczenski.*	Brian, 1949 (115).
Microcine A et B	*Micromonospora* non identifié.	Taira et Fuju, 1952 (83).
Moldine	*Streptomyces phaecochromogenus.*	Maeda et coll., 1952 (116).
Musarine	*Streptomyces non identifié.*	Thaysen et Butlin, 1948 (83).
Myceline	*Streptomyces roseoflavus.*	Aiso et coll., 1952 (83).
Mycosubtiline	*Bacillus subtilis.*	Walton et Woodruff, 1949 (117).
Nigericine	*Streptomyces nigri.*	Harned, 1951 (83).
Phaeofacine	*Strepto. phaeofaciens.*	Maeda et coll., 1952 (116).
Pléodicine	*Streptomyces* n° 272.	Chamey, 1952 (83).
Prodigiosine	*Bacillus prodigiosus.*	Lack, 1949 (118).
Rimocidine	*Streptomyces rimosus.*	Davisson, 1951 (119).
Rotaventine	*Streptomyces reticuli.*	S. Hosoya et coll., 1952 (120).
Thiaurine	*Streptomyces* non identifié.	Bolhofer et coll., 1952 (83).
Thiolutine	*Streptomyces albus.*	Celmer et Tanner, 1952 (83).
Trichomycine	*Streptomyces* H 2609.	Hosoya, 1952 (83).
Trichothécine	*Trichothecium raseum.*	Freeman et Morrison, 1949 (121).
Viridine	*Trichoderma viride.*	Brian et coll., 1946 (122).

entre 3 et 5. La substance est rapidement détruite en milieu alcalin. Sa formule chimique, tout d'abord étudiée par Ford et Leach (123) a été définitivement établie en 1949 (124) :



L'actidione exerce une action inhibitrice très puissante (125) sur certaines levures, mais très faible ou nulle sur les bactéries. En outre, son effet antilevure est spécifique de certains genres : si 0,17 mg par litre suffisent, d'après WHIFFEN, pour inhiber certains *Saccharomyces cerevisiae*, les levures du type *Kl. apiculata* ne sont pas gênées par des doses de l'ordre de 100 mg par litre et davantage. Les bactéries supportent des concentrations de 1 g par litre.

Nos essais ont été réalisés avec quatre produits différents : une actidione cristallisée de point de fusion 116°, fournie par la Upjohn Company (Kalamazoo), préparée avec la souche de *Streptomyces griseus* de WHIFFEN ; un second produit préparé par un laboratoire français, différent du premier par son état de pureté (mélange de 30 p. 100 d'actidione active avec 70 p. 100 d'isoactidione non active) ; un troisième dénommé antifongique 191, et enfin, nous avons essayé les bouillons bruts de culture de *Streptomyces griseus* eux-mêmes.

Nous avons cherché à établir le seuil d'efficacité dans les moûts selon les races de levures et dans les vins selon leur composition, la possibilité de mutage, la stabilité du produit dans les milieux qu'il doit protéger, et vis-à-vis de l'acide sulfureux. Nos chiffres sont donnés en poids d'actidione pure.

Dans les moûts de raisin, avec des ensemencements faibles, mais réalisés au moyen de levain en pleine activité, surtout les levures du type *Saccharomyces cerevisiae* se montrent sensibles à l'actidione : 0,5 mg par litre retarde de deux jours le départ de la fermentation, 1 à 4 mg par litre, de cinq jours. En présence de 5 mg par litre, la fermentation s'amorce dix jours après l'ensemencement, se poursuit à une vitesse très ralentie (1 g de sucre fermenté par jour) et reste incomplète. 10 mg empêchent toute fermentation. Cette concentration suffit aussi pour inhiber les levures des genres *Torulaspora rosei* et *Hansenula*. Par contre, une *Kl. apiculata* a résisté à 200 mg par litre d'actidione.

On constate que cet antibiotique exerce une influence prépondérante sur les levures se développant à l'abri de l'air. Il semble agir peu sur les mécanismes respiratoires et essentiellement sur les processus de la fermentation alcoolique (126). Cependant, l'actidione est incapable d'arrêter une fermentation en marche : elle est absolument sans effet sur les levures d'un moût de raisin en pleine fermentation

Dans un vin, du type le plus fermentescible, titrant 10° d'alcool et 1° Baumé en sucre, l'actidione a été expérimentée sur une cinquantaine de *Saccharomyces* des espèces *ellipsoïdeus, italicus, oviformis, carlsbergensis, bayanus, steineri, chevalieri* et *uvarum*, provenant de divers pays vinicoles. Tous les flacons témoins fermentent dix jours après l'ensemencement. Après un mois d'incubation, quinze de ces levures sont inhibées par 0,1 mg par litre d'actidione ; vingt-neuf par 0,2 mg et six par 0,3 mg

par litre. En outre, l'efficacité de l'antibiotique croît avec le degré alcoolique du vin : pour une même levure dont l'inhibition totale exige 0,2 mg par litre dans un vin de 10° d'alcool, 0,1 mg suffit si le vin titre 12° ou davantage.

D'autre part, nous avons essayé les bouillons bruts de culture de *Streptomyces griseus* qui contiennent d'après WHIFFEN, des quantités importantes d'actidione, de l'ordre de 200 mg par litre.

L'action de ces bouillons n'est pas absolument la même que celle de l'actidione. Alors que l'actidione utilisée à trop faible dose pour provoquer une inhibition complète, modifie la marche de la fermentation durant tout son cours, dans les mêmes conditions les bouillons de Streptomyces ne provoquent qu'une prolongation de la phase de latence : dès qu'elle est amorcée, la fermentation se poursuit normalement.

La richesse des bouillons est variable. Certains ont manifesté un pouvoir antibiotique correspondant à une concentration en actidione de près de 800 mg par litre. Les extraits obtenus par traitement des mycéliums de Streptomyces contiendraient jusqu'à 1 à 2 g d'antifongique, ce qui laisse penser qu'existent dans ces milieux d'autres antifongiques que l'actidione ou que, dans ces milieux bruts, son action est renforcée par un effet de synergisme, en présence d'autres produits.

b) **Mycosubtiline.** — Elle est produite en même temps que la subtiline par *Bacillus brevis*. Elle a été découverte par WALTON et WOODRUFF (117). Extraite par l'alcool des bouillons de culture, c'est une substance blanche, cristallisée, insoluble dans l'eau, soluble en milieu légèrement alcalin, dans l'alcool et dans divers solvants. Thermostable, elle résiste à un chauffage de 15 minutes à 120°. Son point de fusion est 256-257°C. C'est un polypeptide dont l'hydrolyse acide donne un mélange d'acides aminés, parmi lesquels ont été caractérisés l'acide aspartique et la proline.

Nous avons réalisé avec la mycosubtiline fournie par la firme Merck (Rahway, U. S. A), une série d'essais calqués sur le plan d'étude de l'actidione.

Dans un jus de raisin, l'action de l'antibiotique s'exerce avec des intensités variables selon la race de levure expérimentée. Les *Saccharomyces* y sont les plus sensibles. Quel que soit le mode d'aération du milieu, 2 à 3 mg par litre suffisent pour inhiber complètement leur fermentation. Les *Kloeckeras* et les *Torulopsis* supportent des doses de 5 mg par litre ; les *Hansenulas* résistent à 10 mg.

Comme l'actidione, la mycosubtiline agit peu sur la respiration des levures et essentiellement sur la fermentation. Comme elle encore, elle est sans effet sur les levures dans un moût en pleine fermentation.

Dans le vin, l'efficacité de la mycosubtiline n'est pas meilleure que

dans le moût. La stabilisation des vins exige des doses de cet antibiotique égales, parfois même supérieures à celles qui suffisent à inhiber ces mêmes organismes dans le jus de raisin.

c) **Antimycine A.** — Elle est produite par une souche de *Streptomyces* non identifiée. Sa découverte a été faite au laboratoire de Strong. Extraite par l'éther des milieux de culture c'est une substance blanche, soluble dans l'alcool et l'acétone, insoluble dans l'eau. Son point de fusion se situe aux environs de 140°C. Sa formule chimique est $C_{28}H_{40}O_9N_2$(127). On a attribué ses propriétés faiblement acides à la présence d'une fonction phénol dans la molécule. Très stable en solution alcoolique à la température ordinaire, l'antibiotique est détruit par chauffage en milieu alcalin.

A l'inverse de la mycosubtilline, l'action antifongique de l'antimycine A est considérable dans les milieux nutritifs simples et dans les vins, mais nulle dans les milieux contenant des substances organiques, et en particulier dans les jus de raisin. Si 0,5 mg par litre met un vin définitivement à l'abri de toute fermentation, 50 mg dans un moût de raisin ne parviennent pas à gêner les levures elliptiques.

Jusqu'à maintenant, la préparation de l'antimycine A n'a pas dépassé l'échelle du laboratoire. Une fabrication industrielle permettrait l'application de cet antibiotique à la conservation des vins sucrés. La plus remarquable propriété de ce conservateur serait d'être dépourvu de toxicité puisqu'il est détruit par la salive et le suc gastrique.

d) **Candicidine.** — Cet antibiotique a été isolé et préparé sous forme cristallisée dans les laboratoires de Waksman. Il exerce une forte action antifongique sur *Candida albicans*.

D'après nos essais, son action inhibitrice sur *Saccharomyces cerevisiae* est nettement inférieure à celle des antibiotiques précédemment étudiés. Une concentration de 10 mg par litre ne parvient qu'à retarder d'une quinzaine de jours le départ de la fermentation dans un jus de raisin. Une inhibition totale n'a pu être obtenue dans ce milieu ; elle nécessite 6 à 7 mg par litre dans le vin.

e) **Antibiotiques A 228 et A 432.** — Ces deux antibiotiques sont extraits de cultures de *Streptomyces* non identifiés. Ils sont doués de fortes propriétés fongicides et sont inefficaces contre les bactéries.

D'après nos essais, 7 à 8 mg par litre de A 228 interdisent la fermentation d'un moût de raisin et 3 mg celle du vin ; 30 mg par litre suffisent pour arrêter une fermentation en plein développement. C'est jusqu'ici, le seul des antibiotiques étudiés, susceptible d'agir efficacement sur les levures d'un moût en fermentation.

L'action de A 432 se rapproche de celle de la mycosubtiline. Cet antibiotique est aussi actif sur *Saccharomyces cerevisiae* dans le jus de raisin que dans le vin : 5 mg par litre sont nécessaires pour inhiber totalement ces levures dans ces deux milieux.

VI. — Conclusions

Le mode d'action des antibiotiques est à ce jour encore à peu près inconnu. Aucun rapport n'existe entre leur formule chimique, leur origine et leur spectre antimicrobien. Leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de certains microorganismes, bien établies dans un certain milieu, peuvent se trouver totalement changées lorsqu'on passe dans un autre. Toutefois, il est possible de tirer profit de cette spécificité même, qui est le caractère propre des antibiotiques, en favorisant un genre microbien aux dépens d'un autre.

L'actidione douée d'une action antilevure puissante sur certains genres, mais sans action sur d'autres, sans action non plus sur les bactéries, est un produit antibiotique, mais non abiotique. Son innocuité aux doses très faibles d'emploi (128), sa compatibilité avec l'acide sulfureux sa spécificité vis-à-vis des *Saccharomyces* qui précisément sont seuls capables de provoquer la refermentation des vins sucrés, semblent la désigner comme un produit possible de substitution de l'acide sulfureux, ou tout au moins comme un adjuvant permettant de limiter les doses de cet antiseptique aux quantités strictement nécessaires à son rôle antioxygène. En tous cas la solution du problème de la stabilisation des vins sucrés paraît bien être dans cette voie, et grâce à la spécificité des antibiotiques, il est possible de concevoir un produit actif sur les levures à faible dose, et tout à fait inoffensif pour l'homme.

Chapitre VIII

FORMATION PAR BOTRYTIS CINEREA D'UN ANTIBIOTIQUE AGISSANT SUR LES LEVURES

Les moûts du Sauternais, issus de raisins envahis par la « pourriture noble », très riches en sucres réducteurs, fermentent en général lentement et difficilement. Ils doivent leurs caractéristiques de composition au *Botrytis cinerea*, champignon microscopique dont l'action physiologique sur les constituants du raisin s'accompagne d'une conséquence physique, la concentration par évaporation d'eau (129). D'une part, le Botrytis puise dans la baie les aliments azotés et hydrocarbonés et les facteurs de croissance qui lui sont nécessaires et y déverse les produits de son métabolisme ; d'autre part, la pellicule attaquée par le champignon devient un organe mort, l'évaporation de l'eau est facilitée et le jus se concentre. Le moût qu'on exprime de ces raisins pourris a une fermentescibilité très diminuée. Le fait fut observé dès 1888 par Muller-Thurgau (90) sur les vins du Rhin ; cet auteur en trouvait l'explication dans l'appauvrissement du milieu en certaines substances nutritives, indispensables aux levures, telle que l'ammoniaque. Quelques essais conduits au laboratoire nous ont montré cependant que l'activité moindre et la croissance limitée que manifestent les levures dans ces milieux, ont des causes plus complexes.

I. — Essais de fermentation des moûts botrytisés

Dans une première expérience, nous avons fait différents coupages de moûts blancs provenant l'un d'une vendange saine, l'autre de raisins pourris noble. Ces moûts sont filtrés pour éliminer les levures du cru. Puis on prépare une série de flacons qui reçoivent des mélanges plus ou moins riches en moût pourri. Ces mélanges sont ramenés à la même concentration en sucre (12° Baumé) et, afin d'éviter l'influence d'une carence azotée, on ajoute dans chaque milieu 100 mg par litre d'azote ammoniacal sous forme de chlorure d'ammonium. On ensemence et on laisse fermenter à l'abri de l'air à 25°C. A intervalles voulus le sucre restant est dosé dans chacun des flacons et les levures totales sont comptées.

On peut constater alors que les vitesses de fermentation diminuent beaucoup quand augmente la proportion en moût pourri, tandis qu'il se forme davantage d'acidité volatile. Dans cet essai cependant, ni une trop grande richesse en sucre ni une déficience azotée ne peuvent être considérées comme la cause de ce ralentissement.

Cet essai est déjà significatif. Toutefois, on peut arguer que les divers mélanges expérimentés, provenant de deux moûts de composition

très différente, ne sont pas exactement comparables. Afin de réaliser l'uniformité de composition des milieux de base, nous avons été amenés à opérer avec des cultures pures de *Botrytis cinerea* sur moût de raisin et à employer comme milieu de fermentation des moûts ainsi épuisés. La souche de *Botrytis cinerea* utilisée dans ce travail a été prélevée sur un raisin pourri de Sauternes et isolée par passages successifs sur des milieux nutritifs solides. Cette souche est cultivée sur moût de raisin riche en sucre, sans modification du pH naturel. L'activité d'autres souches de Botrytis cultivées sur divers autres milieux de culture sera étudiée dans un paragraphe suivant.

On utilise comme récipients de culture des erlenmeyers d'un litre bouchés d'un tampon d'ouate et contenant 300 cm^3 de moût seulement, afin de réaliser une bonne surface de développement et une aération suffisante. La température la plus favorable pour la culture du Botrytis est voisine de 20°C. A température inférieure ou supérieure la croissance du Botrytis est ralentie.

Pour faciliter l'ensemencement, on utilise comme levain une suspension de spores, obtenue par agitation d'une culture de Botrytis sur moût de raisin, âgée de 8 à 10 jours. On ensemence avec quelques gouttes de ce liquide. Les spores ainsi introduites dans les flacons de culture stérilisés, germent à la surface du moût et un mycélium ne tarde pas à recouvrir toute la surface du liquide. Après 10 à 15 jours de développement, le mycélium est séparé du milieu nutritif et le moût ainsi épuisé est expérimenté.

a) **Enrichissement des moûts botrytisés en certains éléments.** — Les premiers essais effectués avec du moût ayant servi de culture au *Botrytis cinerea* ont montré, comme dans le cas des moûts naturels, que la fermentescibilité du moût était fortement diminuée. Nous nous sommes tout d'abord attachés à restituer au moût pourri les matériaux susceptibles de lui avoir été soustraits et dont on connaît l'importance sur le comportement des levures : azote et vitamines en particulier. On sait que le champignon s'attaque surtout à l'azote ammoniacal du milieu ; toutefois, pour parer à une déficience possible en azote organique, nous avons, outre l'addition d'ammoniaque, essayé l'enrichissement en asparagine, qui assure mieux que tout autre acide aminé la croissance maximum des levures dans un milieu synthétique. Nous avons, de plus, enrichi le moût pourri en vitamine B_1 et nous avons encore introduit l'activeur d'*Aspergillus niger*.

L'expérience suivante a été réalisée. Un certain volume de moût de raisin ayant 200 g de sucre et 46 mg par litre d'azote ammoniacal, est ensemencé de spores de Botrytis. Par ailleurs, on conserve à l'abri de toute contamination une certaine quantité de ce même moût.

Quand la surface du liquide dans les flacons de culture est entièrement recouverte par le mycélium en pleine sporulation, on sépare ce dernier du liquide. Le champignon a abaissé les sucres à 174 g par litre, l'ammoniaque à 18 mg. Le moût de culture est alors ramené à sa concentration initiale en sucres. A l'exception d'un petit volume que l'on fera fermenter après simple décantation, le reste du moût pourri est ramené aussi à sa teneur initiale en azote ammoniacal et réparti dans une série de flacons.

On garde un de ces flacons tel quel ; chacun des autres reçoit respectivement 0,5 mg par litre de vitamine B_1, 500 mg par litre d'activeur fongique, 100 mg par litre d'asparagine. En outre, l'un des flacons fermentera en présence d'une quantité de mycélium finement broyé correspondant à son volume et un autre sera chauffé à 120°C pendant 20 minutes.

On ensemence ces divers milieux avec *S. ellipsoïdeus* n° 51 et on laisse fermenter à 25°C dans les deux conditions habituelles d'aération. On suit la marche des fermentations.

Les mêmes résultats se retrouvent dans les deux conditions d'aération, mais le manque d'oxygène accuse plus fortement les écarts. Aussi, nous contenterons-nous d'étudier comparativement, à l'abri de l'air seulement, les fermentations du moût sain et du moût pourri différemment traités. Le tableau XVI rassemble les résultats obtenus.

Douze jours après l'ensemencement, la fermentation du moût sain est terminée. Tout le sucre est pratiquement transformé, le nombre des levures atteint 60 000 par mm^3. A ce moment, la fermentation n'a touché que la moitié du sucre du moût pourri et la population finale de ce milieu est inférieure de 33 p. 100 à la précédente.

La fermentation du moût pourri ramené à sa teneur initiale en azote ammoniacal, est à peine améliorée. L'asparagine n'a, non plus, aucun effet accélérant ; elle augmente le nombre de levures au début de la fermentation, qui se poursuit ensuite comme s'il n'y avait pas eu d'addition. De même, la vitamine B_1 ne modifie pratiquement pas la marche de la fermentation du moût pourri. L'activeur fongique paraîtrait un peu plus efficace au premier abord. Il provoque une légère accélération, qui se traduit par une avance de 11 g de sucre au cinquième jour. Mais cette addition au moût sain accélère sa fermentation de la même manière et le même écart subsiste.

Par contre, l'action du chauffage est bien plus importante. Sans lui redonner toutefois la fermentescibilité du moût sain, le chauffage prolongé du moût pourri à 120°C accélère considérablement la vitesse de fermentation. La diminution du nombre total des levures n'est plus que de 12 p. 100. Alors que l'acidité volatile en fin de fermentation est toujours plus élevée dans les moûts pourris, l'intervention d'un chauffage la ramène au même taux que celui qui est produit dans le moût sain.

TABLEAU XVI

Fermentation du moût pourri après addition des substances épuisées par le Botrytis

Sucre en g par litre. Levures en milliers par mm³.

		5 jours	7 jours	12 jours	Sucre restant après 1 mois	Acidité volatile
Moût sain	Sucre fermenté.....	116	158	194	3,4	0,48
	Nombre de levures.....	*52*	*58*	*60*		
Moût pourri décanté	Sucre fermenté.....	8	29	123	5,4	0,78
	Nombre de levures.....	*3*	*25*	*40*		
Moût pourri ramené à la teneur initiale en NH_4	Sucre fermenté.....	13	39	133	5,4	0,82
	Nombre de levures.....	*4*	*25*	*38*		
Moût pourri + 0,5 mg B_1	Sucre fermenté.....	13	50	136	5,4	5,78
	Nombre de levures.....	*4*	*25*	*35*		
Moût pourri + 0,5 g activeur	Sucre fermenté.....	24	49	140	5,4	0,60
	Nombre de levures.....	*11*	*31*	*45*		
Moût pourri + asparagine	Sucre fermenté.....	13	39	133	5,4	0,67
	Nombre de levures.....	*11*	*36*	*36*		
Moût pourri + mycélium	Sucre fermenté.....	110	159		2,5	0,74
	Nombre de levures.....	*68*	*68*			
Moût pourri chauffé à 120°C	Sucre fermenté.....	100	142	173	4,6	0,42
	Nombre de levures.....	*49*	*51*			

L'addition au moût pourri de mycélium de Botrytis broyé agit encore plus fortement que le chauffage. En sa présence, la fermentation du moût pourri reprend une vitesse très comparable à celle du moût sain et la population finale est même supérieure à celle de ce dernier.

En résumé, le moût pourri fermente beaucoup plus lentement que le moût avant culture. Ce n'est pas une carence en ammoniaque, en azote organique ou en vitamine B_1 qui est ici en cause. L'addition de mycélium de Botrytis broyé qui redonne à la fermentation du moût pourri toutes les caractéristiques de celle du moût sain, pourrait nous amener à invoquer cependant un phénomène de carence. Le mycélium broyé diminue la vitesse de fermentation du moût sain; ajouté au moût pourri, il l'accélère. Il semble bien, comme cela sera démontré plus loin, qu'il y ait dans le mycélium des substances activantes à côté de substances inhibitrices.

Par contre, le chauffage accélère fortement la vitesse de fermentation du moût pourri. Il ne peut agir que par destruction, et il faut donc admettre que le retard subi par la fermentation du moût pourri est due à la présence de substances détruites en grande partie à 120°C.

b) **Action des diverses sécrétions fongiques.** — Le *Botrytis cinerea*, en culture sur moût de raisin, synthétise un certain nombre de substances,

dont certaines sont bien connues. LABORDE a constaté que la combustion du sucre par la moisissure s'accompagne de la formation de notables quantités de glycérol (130). Le champignon sécrète en outre un grand nombre de diastases qui assurent l'assimilation des matières protéiques et glucidiques, par exemple l'oxydase et la cytase ou cellulase. Quoique parfois importantes, les quantités de glycérol contenues dans les moûts pourris ne peuvent gêner les levures. Par contre, les effets oxydants de l'oxydase et la présence de dextrane, dont la production est due à la cellulase, pourraient nuire, pour des raisons d'ailleurs très différentes, à la fermentation alcoolique des moûts pourris.

Nous avons étudié l'influence de tous ces facteurs sur la fermentation du moût de raisin pourri en cherchant à les éliminer ou, au contraire, en les ajoutant en excès dans un milieu sain, au cours de plusieurs séries d'essais.

Influence sur la fermentation du dextrane et des spores de Botrytis. — Le dextrane, polymère du glucose d'un poids moléculaire de plusieurs millions, est produit par le Botrytis à partir de la cellulose ou des sucres du raisin. Lorsque le champignon est cultivé *in vitro*, le dextrane s'accumule sous le mycélium, formant une véritable zooglée lisse et visqueuse. Une petite quantité passe en solution dans le milieu de culture. Le dextrane est précipité intégralement dans l'alcool à 25°, agglutiné en filaments plus ou moins longs. Dans nos cultures, nous en avons recueilli une assez forte quantité qui, lavée à l'alcool a été redissoute dans un moût sain qui prend alors un aspect visqueux. D'après MOREAU, « il est possible que le dextrane retarde la fermentation des vins qui en sont très chargés » (131). En réalité, la fermentation du moût enrichi en dextrane a été plutôt légèrement activée. Dans nos conditions d'expérience, il est certain que le dextrane ne joue aucun rôle inhibiteur dans la fermentation du moût pourri.

On aurait pu penser que la présence de spores de Botrytis, très nombreuses dans le moût pourri, pouvaient inhiber les levures par un phénomène d'antagonisme. Ces spores peuvent être retenues par filtration serrée, qui du reste retient encore le dextrane. Un essai effectué dans ce sens a montré que la filtration du moût pourri favorise bien un peu le départ de la fermentation, mais au quatrième jour l'écart ne porte que sur 16 g de sucre fermenté et au septième jour le sucre fermenté et le nombre des levures sont identiques dans les deux milieux (tableau XVII). La vitesse de fermentation du moût pourri filtré reste donc toujours très inférieure à celle du même moût sain. La présence de dextrane et de spores de Botrytis ne peut donner l'explication des inhibitions constatées.

Action des diastases fongiques. — On sait depuis LABORDE (132) que le Botrytis élabore notamment une polyphénol-oxydase, qui provoque en présence de l'oxygène de l'air, l'oxydation des polyphénols.

C'est le phénomène de la casse oxydasique. D'autre part, la sécrétion par certaines moisissures de glucose-oxydase qui provoque l'oxydation du glucose en acide gluconique avec libération d'eau oxygénée dans le milieu, a été étudiée par plusieurs auteurs. Récemment, Peynaud et Charpentié (133), dosant l'acide gluconique dans les vins et les moûts de raisin, ont montré que, si les moûts sains en sont pratiquement dépourvus, on peut en trouver des doses allant jusqu'à 2g par litre dans les moûts botrytisés et les vins qui en proviennent. La présence de glucose-oxydase est donc vraisemblable dans de tels moûts, mais les quantités d'eau oxygénée formées ne paraissent pas susceptibles cependant de provoquer des inhibitions aussi fortes que celles que nous avons pu observer. D'ailleurs, les oxydases sont très sensibles à la chaleur et sont détruites à des températures voisines de 80°C. Or, en portant un moût pourri à 100° avant l'ensemencement et en le refroidissant rapidement, ce qui le met à l'abri de l'activité des diastases oxydantes, on ne redonne pas au moût pourri une fermentescibilité meilleure, quoiqu'on augmente légèrement la croissance levurienne au cours de la fermentation.

Tableau XVII

Elimination du dextrane et des spores de Botrytis par filtration

Sucre en g par litre. Levures en milliers par mm³

		2 jours	4 jours	7 jours
Moût sain	Sucre fermenté	59	128	192
	Nombre de levures	*45*	*52*	*60*
Moût pourri	Sucre fermenté	6	90	172
	Nombre de levures	*4*	*28*	*34*
Moût pourri filtré	Sucre fermenté	34	106	172
	Nombre de levures	*14*	*30*	*34*

En résumé, l'inhibition provoquée par le *Botrytis cinerea* dans la fermentation du moût pourri, n'est imputable ni au dextrane, ni à la présence de spores dans le moût. Elle ne peut être due que pour une très faible part à l'activité des oxydases sécrétées par le Botrytis. Il faut donc admettre que dans le moût botrytisé, et déjà appauvri en éléments nécessaires à la croissance des levures, à la très faible action qu'exercent certains produits déjà connus du métabolisme fongique, s'ajoute l'action beaucoup plus considérable de substances inhibitrices encore inconnues, véritables antibiotiques des levures.

c) **Action de l'anhydride sulfureux.** — Tout d'abord, pour tenter de rapprocher ces substances inhibitrices d'autres antibiotiques connus,

nous avons essayé l'influence sur la fermentation du moût pourri de produits que l'on sait pouvoir détruire l'activité de certains antibiotiques. La cystéine par exemple, d'après WAKSMAN, possède cette propriété vis-à-vis de la streptomycine. La cystéine retarde légèrement la fermentation et diminue la population du moût sain, mais elle n'a pratiquement aucun effet sur la fermentation du moût pourri.

Par contre, l'action de l'anhydride sulfureux à faible dose sur le moût pourri est remarquable. Au cours de plusieurs essais, on a pu constater que 50 mg par litre d'anhydride sulfureux ajoutés au moût sain ne modifient pratiquement pas sa fermentation, alors que les mêmes quantités ajoutées au moût pourri accélèrent la marche de sa fermentation à tel point qu'elle se rapproche de celle du moût sain ; en outre, la population des levures est fortement augmentée. Le tableau XVIII en donne un exemple. Alors que le nombre des levures est diminué de 43 p. 100 dans le moût pourri, cette diminution n'est plus que de 22 p. 100 lorsqu'on ajoute 50 mg d'anhydride sulfureux par litre.

TABLEAU XVIII

Action de l'anhydride sulfureux sur la fermentation du moût pourri

Sucre en g par litre. Levures en milliers par mm³.

		2 jours	4 jours	7 jonrs	Sucre restant après 1 mois
Moût sain	Sucre fermenté	59	128	192	2,6
	Nombre de levures	*45*	*52*	*60*	
Moût pourri	Sucre fermenté	6	60	172	6,2
	Nombre de levures	*4*	*28*	*34*	
Moût sain + 50 mg SO_2	Sucre fermenté	56	123	196	3,4
	Nombre de levures	*46*	*53*	*60*	
Moût pourri + 50 mg SO_2	Sucre fermenté	20	123	183	4,4
	Nombre de levures	*31*	*48*	*47*	

Le fait a d'ailleurs pu être observé dans la pratique de la vinification en Sauternais. L'addition d'une faible dose d'anhydride sulfureux dans une barrique de moût botrytisé, avant le départ de la fermentation, favorise toujours la fermentation (58). L'anhydride sulfureux détruit l'antibiotique, soit en le réduisant, soit en se combinant avec lui.

Nous avons donc mis en évidence la présence, dans le moût de raisins botrytisés, de substances antibiotiques antilevures détruites en grande partie par l'anhydride sulfureux et ne résistant pas à un chauffage prolongé à 120°C. Nous désignerons dorénavant ces substances sous le nom de « *botryticine* ».

Précisons tout de suite que cet antibiotique a peu de chances de trouver une utilisation dans la pratique de la conservation des vins sucrés, puisque le sulfitage le détruit. Quoiqu'il en soit, son étude est fort intéressante, car il est présent naturellement dans les moûts de raisins pourris ; il joue en vinification un rôle certain qu'il faut connaître.

II. — Essais de séparation et de purification de la botryticine

Nous avons tenté d'extraire la botryticine du moût pourri, tout d'abord au moyen de solvants, puis par floculation par l'alcool éthylique, enfin par adsorption sur le charbon activé en poudre.

Pour doser l'activité des préparations antibiotiques ainsi obtenues, nous opérons de la manière suivante : la préparation à étudier est ajoutée à un certain volume de moût de raisin qu'on ensemence ensuite avec quelques gouttes d'un levain frais du *Saccharomyces cerevisiae* n° 51 de notre collection. On suit la marche de la fermentation comparativement à celle du même moût sain fermentant dans les mêmes conditions expérimentales, mais sans addition de préparation inhibitrice, et qui constitue le témoin. De l'inhibition subie par la levure utilisée, constatée par comparaison des fermentations du moût témoin et du moût pourri, on estime qualitativement l'activité de cette préparation.

a) **Extraction par solvants.** — Nous citons pour mémoire les extractions du moût pourri par les solvants classiques : éther sulfurique, éther de pétrole, etc..., qui ont été essayées sans succès. Le moût pourri était longuement agité à trois reprises avec son volume de solvant ou traité dans un appareil d'extraction continue. Le résidu de la distillation du solvant n'a montré aucun effet inhibiteur. De même, le floculat obtenu par précipitation avec 70 p. 100 en volume d'acétone n'en a pas davantage.

Par contre, un essai concluant a montré que l'alcool éthylique permet une bonne insolubilisation de l'antibiotique.

b) **Précipitation par l'alcool éthylique.** – Lorsqu'on porte un moût pourri à 70 ou 80° d'alcool, il se forme un lourd précipité brun qui, après quatre à cinq jours de repos, est recueilli par centrifugation, lavé à l'alcool neutre et égoutté. Ajouté à un volume de moût sain, égal au volume du moût pourri traité, l'inhibition provoquée par ce floculat est aussi forte que celle qu'on observe lorsque le moût a servi de milieu de culture au Botrytis (fig. 12 et 13). Il est, de plus, possible de le dissoudre dans un volume plus faible de moût et de renforcer ainsi l'action de la botryticine.

On peut de même extraire la botryticine du mycélium du Botrytis finement broyé. A cet effet, celui-ci est lavé à plusieurs reprises à l'eau

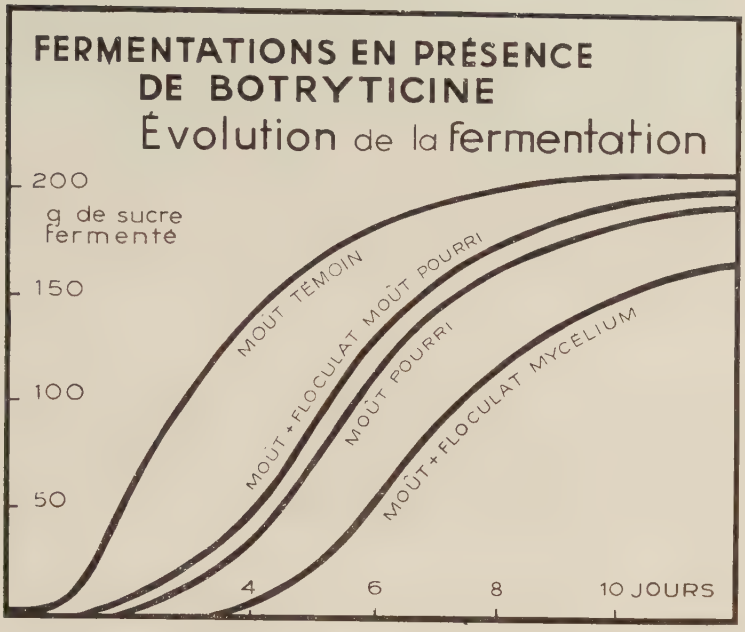

FERMENTATIONS EN PRÉSENCE
DE BOTRYTICINE
Évolution de la fermentation
200
g de sucre
fermenté
150
100
50
MOUT TÉMOIN
MOÛT + FLOCULAT MOÛT POURRI
MOÛT POURRI
MOÛT + FLOCULAT MYCÉLIUM
4
6
8
10 JOURS

FIG. 12

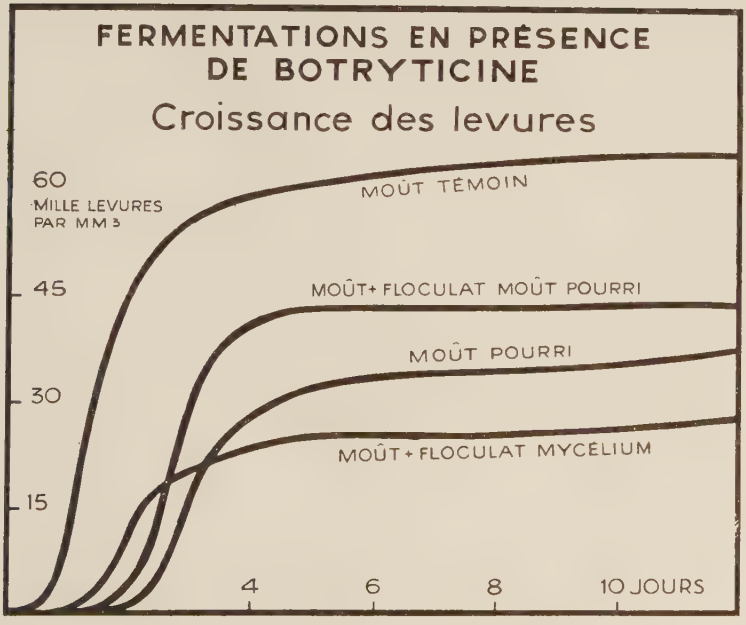

FERMENTATIONS EN PRÉSENCE
DE BOTRYTICINE
Croissance des levures
60
MILLE LEVURES
PAR MM 3
45
30
15
MOÛT TÉMOIN
MOÛT+ FLOCULAT MOÛT POURRI
MOÛT POURRI
MOÛT + FLOCULAT MYCÉLIUM
4
6
8
10 JOURS

FIG. 13

tiède bouillie. Débarrassé du dextrane par un premier traitement à 25° d'alcool, l'extrait aqueux porté à 80° d'alcool donne un floculat blanc, abondant, dont l'effet inhibiteur sur les levures est très marqué. Les substances antibiotiques sécrétées par le Botrytis se trouvent donc également dans le mycélium et elles diffusent dans le moût de culture.

Nous traiterons successivement : 1° de la solubilité des préparations alcooliques dans le moût sain ; 2° du degré alcoolique indispensable à la floculation complète de la botryticine ; 3° d'un essai de purification par précipitations successives par l'alcool ; 4° de la conservation de ces floculats alcooliques.

c) **Solubilité de la botryticine dans le moût.** — Le floculat obtenu en portant le moût pourri à 80° d'alcool est, outre la substance antibiotique qu'il contient, surchargé de matières d'origine non fongique : gommes, mucilages, pectines, arabanes, protéines, etc... Ces substances existent du reste également dans tous les moûts obtenus avec des raisins parfaitement sains.

Séparées du moût sain par précipitation alcoolique et ajoutées à un autre moût sain, ces matières en freinent déjà assez fortement la fermentation. Il en est de même lorsqu'on traite du moût de bière non houblonné.

Cette observation précise une notion particulièrement importante au point de vue pratique. Le raisin sain, mûr, contient à côté de substances qui favorisent le développement des levures et activent la fermentation alcoolique, acides aminés et vitamines fonctionnant comme facteurs de croissance et autres facteurs encore inconnus, des substances qui, au contraire, gênent et peuvent empêcher le développement des levures et retardent la fermentation. Les fermentescibilités très diverses des moûts de raisin observées dans la pratique trouvent dans ces notions leur explication profonde. Nous retrouvons ici une opinion que développait Bastin dans un mémoire récent (134) : « En règle générale, la cellule vivante renferme côte à côte des accélérateurs et des inhibiteurs aux concentrations sans cesse variables ».

Ces floculats alcooliques ne se dissolvent jamais complètement dans le moût. Il se forme un dépôt brunâtre au fond des flacons. Lorsqu'après 24 heures de contact avec le moût on sépare ce dépôt, on constate que toute la substance inhibitrice a été dissoute dans le liquide ; le dépôt insoluble reste inactif. Il en est de même du floculat obtenu à partir des eaux de lavage du mycélium de Botrytis.

d) **Degré alcoolique optimum de floculation de la botryticine.** — Pour préciser les meilleures conditions de précipitation, nous avons réalisé l'essai suivant. Le moût pourri et les eaux de lavage du mycélium sont traités séparément et de la même manière. Quatre parts égales sont faites

de chaque volume. Après élimination du dextrane dans l'alcool à 30°, nous portons chacune d'elles respectivement à 50, 60, 70, 80° d'alcool. Il se produit un abondant précipité, dont le poids sec est évalué sur une fraction. Rapportés au litre, ces poids sont donnés dans le tableau XIX.

Ces divers floculats, égouttés, sont ajoutés à un volume de moût sain titrant 230 g de sucre par litre. Le tableau XIX donne les résultats de ces essais. L'action du floculat de moût pourri obtenu à 50° d'alcool se manifeste par un retard du départ de la fermentation du milieu dans lequel il a été ajouté ; mais très vite la marche de la fermentation se rapproche de celle du moût témoin. Le nombre de levures final n'est diminué que de 20 p. 100.

TABLEAU XIX

Activité des floculats de moûts pourris en fonction du degré alcoolique de précipitation

Moût de 230 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

	Poids sec du précipité g		7 jours	11 jours	22 jours	30 jours sucre restant
Témoin sain		Sucre fermenté	147	179	189	38
		Nombre de levures	*42*	*56*	*49*	
+ Floculat obtenu à 50° d'alcool	3,98	Sucre fermenté	144	172	177	50
		Nombre de levures	*35*	*39*	*39*	
+ Floculat obtenu à 60° d'alcool	4,08	Sucre fermenté	10	123	172	55
		Nombre de levures	*5*	*27*	*33*	
+ Floculat obtenu à 70° d'alcool	7,04		Pas de fermentation			230
+ Floculat obtenu à 80° d'alcool	7,60		Pas de fermentation			230

Le floculat obtenu à 60° provoque un retard plus accentué. En sa présence la fermentation ne se déclare que 7 jours après l'ensemencement, alors que les trois-quarts du sucre initial sont déjà transformés dans le témoin. Le nombre total des levures en fin de fermentation est inférieur de 32 p. 100 à celui du témoin. Les floculats de moût pourri à 70 et 80° d'alcool ont rendu toute fermentation impossible : les levures ont été complètement inhibées.

Les mêmes observations ont pu être faites quant à l'efficacité des floculats des eaux de lavage du mycélium, obtenus à différentes concentrations en alcool. L'importance de l'inhibition provoquée par les floculats alcooliques croît donc avec le degré alcoolique auquel ils ont été floculés. L'écart est surtout très marqué entre 60 et 70°. 70° constituent le seuil

minimum d'une floculation satisfaisante de la botryticine, mais 80° d'alcool permettent d'obtenir la précipitation complète.

Cependant, les floculats ainsi obtenus renferment surtout des matières colloïdales indifférentes ou inhibitrices qu'on trouve dans tous les moûts de raisin, car il n'est pas possible de précipiter totalement la véritable substance antibiotique sans les entraîner. La séparation de ces matériaux inhibiteurs ou non, constitue tout le problème de la purification de la botryticine. A cet effet nous avons utilisé des précipitations successives des colloïdes moins solubles que la botryticine.

e) **Précipitations successives par l'alcool des substances inhibitrices.** — Avec un moût sur lequel on a laissé se développer durant 15 jours une culture de *Botrytis*, nous avons réalisé l'essai suivant :

On fait trois parts égales du volume total. La première est précipitée par l'alcool à 80°. La seconde subit deux précipitations : le premier floculat à 80° d'alcool est dissous dans l'eau, et la solution aqueuse est à nouveau floculée immédiatement à 80°. Enfin, la troisième subit trois précipitations consécutives dans les mêmes conditions.

La couleur du premier floculat est brun foncé ; au fur et à mesure des précipitations, la couleur des floculats s'éclaircit. Le troisième floculat, dont le poids n'est plus que les deux-tiers du floculat initial, est blanchâtre.

Chacun des différents floculats provient d'un volume de moût pourri 5 fois supérieur au volume du moût sain dans lequel il est ajouté. On ensemence ces moûts après addition des floculats et on laisse fermenter à l'abri de l'air à 25°C. On suit les fermentations comparativement à celle du même moût gardé sain.

De l'examen du tableau XX qui expose les résultats obtenus, on constate que les retards provoqués sont toujours considérables et restent du même ordre de grandeur après une, deux ou trois précipitations successives (à la condition cependant que ces précipitations soient effectuées immédiatement après la dissolution dans l'eau des floculats). Au bout du huitième jour par exemple, la fermentation est pratiquement terminée dans le témoin sain, elle ne fait que débuter en présence des floculats obtenus en une, deux, trois précipitations consécutives ; elle laissera, après plus d'un mois, des quantités importantes de sucre dans le liquide.

Par contre, lorsque les précipitations successives sont effectuées en laissant un repos de 24 heures entre chacune d'elles, la fermentation est beaucoup moins retardée. Il y a certainement une destruction spontanée de l'antibiotique au cours de ce repos. Le fait est encore plus net lorsque le floculat reste plus de 48 heures en solution.

Les floculats obtenus à partir des moûts pourris chauffés à 100°C avant toute précipitation, nous permettent de faire une observation

intéressante : l'inhibition provoquée par le floculat est du même ordre de grandeur, quel que soit le temps de repos en solution aqueuse.

TABLEAU XX

Précipitations successives par l'alcool de la botryticine
Moût de 205 g par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

		6 jours	8 jours	14 jours	30 jours sucre restant
Témoin sain.....	Sucre fermenté.....	174	203	200	4
	Nombre de levures.....	*51*	*53*	*55*	
+ 1er floculat.....	Sucre fermenté.....		0	92	77
	Nombre de levures.....		*10*	*30*	
+ 2e floculat.....	Sucre fermenté.....		0	126	70
	Nombre de levures.....		*5*	*35*	
+ 3e floculat.....	Sucre fermenté.....		3	125	64
	Nombre de levures.....		*2*	*30*	
+ 3e floculat (48 h d'attente)	Sucre fermenté.....	52	138	205	6
	Nombre de levures.....	*28*	*35*	*44*	

Ces observations indiquent que le pouvoir antibiotique de la préparation aqueuse se détruit rapidement à la température ordinaire sous l'action des oxydases ou autres diastases du milieu, tandis qu'il est conservé par un chauffage de la préparation à 100°C. Il y a donc intérêt avant toute autre manipulation, à porter rapidement le moût pourri et l'extrait aqueux du mycélium à cette température pour les stabiliser.

f) **Conservation des préparations alcooliques de botryticine.** — Nous précisons tout d'abord l'influence du chauffage sur la stabilisation des solutions aqueuses de botryticine. Le floculat alcoolique provenant de 800 cm³ de moût pourri est dissous dans 400 cm³ d'eau bouillie froide. On élimine par centrifugation le résidu insoluble et on fait deux parts égales de la solution : l'une est gardée telle quelle, la deuxième est chauffée un quart d'heure à 100°C au bain-marie. Les deux liqueurs sont ensuite conservées à l'air, à température ambiante, pendant trois jours. Après ce temps, on traite chacune d'elles à 80° d'alcool et on les ajoute à 150 cm³ de moût de raisin titrant 250 g de sucre par litre. On fait fermenter la levure n° 51 dans chacun de ces milieux et parallèlement dans le même moût gardé sain, à 25°C, à l'abri de l'air.

L'inhibition provoquée par chacun des floculats est importante : le retard de la fermentation par rapport à celle du témoin est de l'ordre d'une centaine de grammes de sucre au début de la fermentation. Cependant la

solution conservée pendant trois jours sans chauffage préalable a perdu un cinquième environ de son pouvoir antibiotique. Les solutions de floculat provenant des moûts botrytisés conservent donc beaucoup mieux leur activité antilevure lorsqu'on les stabilise par un chauffage à 100°C.

Nous avons conduit plusieurs séries d'essais pour fixer les conditions de conservation de la botryticine au cours d'une longue durée. Le floculat alcoolique de 3,5 l de moût pourri est dissous dans la moitié de son volume d'eau bouillie froide. La liqueur est rapidement portée à 100°C et après refroidissement, on élimine par centrifugation la partie insoluble. La solution est alors partagée en 7 volumes égaux qui sont conservés pendant un mois dans les conditions suivantes :

1° Sous forme de solution, en flacon bouché plein, à la température ordinaire.

2° Sous forme de solution, en flacon rempli aux deux tiers et bouché par un tampon d'ouate.

3° Sous forme de solution, en flacon bouché plein, à la glacière à 0° environ.

4° Sous forme de floculat conservé dans l'alcool de floculation à la température ambiante.

5° Sous forme de floculat conservé dans l'alcool de floculation à la température de 0°.

6° Sous forme de floculat à l'état sec (après centrifugation et séchage spontané), à la température ambiante.

7° Sous forme de floculat à l'état sec, à la température de 0°.

Après un mois, les solutions 1, 2, 3, sont floculées à 80° d'alcool et les différents floculats sont ajoutés à 150 cm^3 de moût sain qui reçoivent ainsi une quantité de substance antibiotique provenant de trois fois leur volume de moût pourri. Les fermentations s'opèrent à 25°C, à l'abri de l'air ; le moût sain titre 238 g de sucre par litre. Le tableau XXI reproduit la marche des fermentations.

Après un mois de conservation, l'inhibition la plus forte est donnée par le floculat gardé en glacière dans son alcool de floculation (préparation 5) : au septième jour par exemple, le retard sur la fermentation témoin est de 165 g de sucre. Le floculat conservé de la même manière, mais à la température ambiante, montre un effet inhibiteur à peine atténué. Les diverses solutions aqueuses freinent encore la fermentation, mais on peut estimer, comparativement à l'inhibition provoquée par les préparations 4 et 5, qu'elles ont perdu les deux tiers environ de leur pouvoir inhibiteur original.

Conservée sous forme de floculat sec en glacière, la préparation 7 est bien moins active que la préparation 4, mais son efficacité est cependant assez marquée. Au septième jour par exemple, le retard provoqué, par rapport à la fermentation témoin, est de 104 g de sucre ; en fin de fermen-

tation, le nombre total des levures est diminué de 50 p. 100. Mais la préparation de floculat sec à la température ambiante, ne possède plus trace de pouvoir inhibiteur. Le flacon contenant ce floculat fermente exactement comme le témoin. Sans aucune manipulation, sans variation sensible de poids, par simple repos à l'air, cette préparation est donc devenue complètement inactive. Ces faits sont extrêmement importants pour la

TABLEAU XXI

Conservation de la botryticine dans différentes conditions

Fermentation d'un moût de raisin, de 238 g de sucre, à l'abri de l'air.

		5 jours	7 jours	10 jours	21 jours	1 mois après sucre restant
Témoin	Sucre fermenté	163	176	188	200	38
	Nombre de levures	*40*	*46*	*48*	*48*	
(1) En solution à l'abri de l'air	Sucre fermenté	107	125	149	171	62
	Nombre de levures	*16*	*27*	*30*	*35*	
(2) En solution à l'air	Sucre fermenté	107	113	146	171	59
	Nombre de levures	*17*	*27*	*31*	*35*	
(3) En solution à l'abri de l'air à 0°C	Sucre fermenté	82	100	142	171	62
	Nombre de levures	*16*	*25*	*29*	*30*	
(4) Dans l'alcool	Sucre fermenté		21	66	113	125
	Nombre de levures		*7*	*11*	*21*	
(5) Dans l'alcool à 0°C	Sucre fermenté		11	30	72	133
	Nombre de levures		*2*	*4*	*12*	
(6) Etat sec	Sucre fermenté	163	176	188	200	38
	Nombre de levures	*33*	*35*	*42*	*46*	
(7) Etat sec à 0°C	Sucre fermenté	46	72	83	113	125
	Nombre de levures	*9*	*12*	*20*	*24*	

poursuite de nos essais. On peut en effet, en tirer les conclusions suivantes :

1° C'est sous forme de floculat dans l'alcool de floculation, à basse température, que la substance inhibitrice extraite du moût pourri se conserve le mieux.

2° Deux précipitations successives dans l'alcool donnent une préparation de la substance antilevure déjà un peu mieux purifiée.

3° Enfin, le fait qu'au bout d'un mois, la substance antibiotique est totalement détruite dans certaines conditions et pas dans d'autres, est une preuve formelle supplémentaire de la réalité de la botryticine.

g) **Action de divers facteurs sur les fermentations en présence de botryticine.** — Nous avions déjà étudié l'action de l'anhydride sulfureux

sur la fermentation du moût botrytisé. Pour nous assurer de l'identité de la substance ainsi détruite dans le moût pourri et de celle qui est extraite par floculation de ce même moût, nous avons réalisé l'expérience suivante : On fait une solution aqueuse du floculat obtenu par double traitement à 80° d'alcool, à partir de 3 litres de moût pourri. Portée rapidement à 100°C et refroidie, on l'introduit dans un moût de raisin ayant 220 g de sucre par litre de telle façon que la concentration en botryticine soit 4 fois plus forte que dans le moût pourri initial. Un volume sert de témoin ; un autre volume reçoit 50 mg d'anhydride sulfureux par litre, enfin une troisième fraction est traitée par la quantité de charbon activé suffisante pour le décolorer. On fait fermenter à 25°C, à l'abri de l'air. La figure 14 représente les courbes de fermentation.

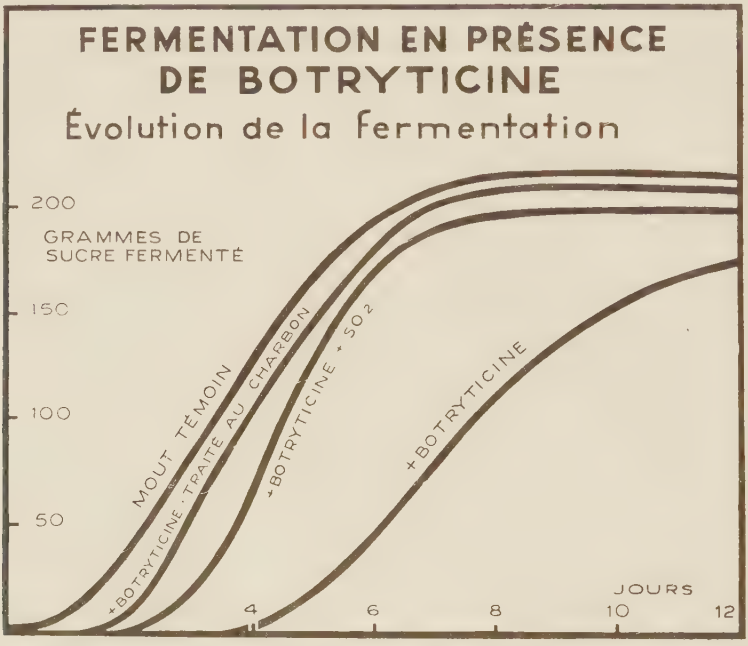


Fig. 14.

Dans ces conditions, l'action de ce floculat est assez marquée : 95 g de sucre sont déjà fermentés dans le moût sain lorsque la fermentation commence à peine à se manifester. Le nombre total de levures est diminué de 20 p. 100.

50 mg d'anhydride sulfureux par litre détruisent une grande partie du pouvoir inhibiteur ; la fermentation est accélérée et se rapproche de celle du témoin, et le nombre final de levures est le même que dans le témoin. D'autre part, le traitement au charbon enlève la presque totalité du pouvoir inhibiteur ; la botryticine est donc adsorbable par le charbon activé en poudre.

Un essai identique, réalisé avec le floculat des extraits aqueux de mycélium, a donné les mêmes résultats.

Il nous a donc été possible de refaire sur la fermentation d'un moût de raisin qui a été additionné de floculat de moût pourri, exactement les mêmes observations que celles qui furent déjà faites sur la fermentation des moûts ayant servi de culture au Botrytis. La substance extraite par floculation à l'alcool est donc bien celle qui inhibe la fermentation des moûts pourris.

III. — Extraction de la botryticine par le charbon activé

Nous avons vu dans l'expérience précédente que le charbon activé retient d'une manière satisfaisante la substance inhibitrice contenue dans le moût pourri. En conséquence, nous avons essayé de baser sur cette propriété une méthode d'extraction et de purification de la botryticine.

Nous avons étudié : 1° l'extraction par traitement direct du moût pourri au moyen du charbon activé et élution, en précisant le pH optimum d'extraction et les meilleures conditions de l'élution ; 2° la purification des préparations, tout d'abord par précipitation à l'alcool éthylique suivie d'une adsorption au charbon, puis par adsorptions au charbon et élutions successives ; 3° nous avons enfin conduit quelques essais de purification, par adsorption sur phosphate tricalcique et par dialyse.

a) **Adsorption de la botryticine des moûts pourris sur charbon activé.** — Afin de fixer la proportion d'antibiotique adsorbé par le charbon activé laissé en contact avec le moût pourri, et d'identifier cette substance comme étant celle que nous précipitions préalablement par l'alcool, nous avons réalisé l'essai suivant : après stabilisation à 100°C, on fait deux parts égales d'un volume de 500 cm³ de moût pourri. La première est traitée directement par l'alcool à 80 p. 100. La deuxième reçoit 20 g par litre de charbon activé ; après 24 heures de contact, on filtre et le liquide décoloré est de même traité par l'alcool à 80 p. 100. Les deux floculats ainsi obtenus sont ajoutés à 150 cm³ d'un moût sain titrant 150 g de sucre par litre. On fait fermenter à 25°C à l'abri de l'air, comparativement au même moût sain sans addition.

En présence du floculat de moût pourri, le départ de la fermentation est retardé de 5 jours. Après 11 jours, 67 g de sucre seulement ont été fermentés, alors que la fermentation du témoin est terminée. La fermentation reste donc très incomplète ; elle laisse 41 g de sucre résiduel dans le milieu (tableau XXII).

Par contre l'addition du floculat du moût pourri débarrassé de l'antibiotique par le charbon activé, ne ralentit plus que très légèrement la

fermentation. L'écart avec la fermentation témoin porte sur 45 g de sucre au troisième jour, mais il n'est plus que de 18 g au onzième jour et la fermentation transforme tout le sucre.

Le charbon activé retient donc, sinon la totalité, du moins la plus grande partie de la substance inhibitrice.

TABLEAU XII

Adsorption de la botryticine par le charbon activé

Moût de raisin de 150 g de sucre par litre. Fermentation anaérobie.

		3 jours	5 jours	11 jours	1 mois sucre restant
Moût témoin.....	Sucre fermenté	70	109	143	3,5
	Nombre de levures	*31*	*36*	*44*	
Moût + floculat de moût pourri	Sucre fermenté		12	67	41
	Nombre de levures		*16*	*31*	
Moût + floculat de moût pourri traité au charbon.	Sucre fermenté	25	67	125	8
	Nombre de levures	*22*	*27*	*41*	

b) **Élution du charbon activé.** — Nous avons essayé pour extraire la botryticine fixée sur le charbon activé, diverses liqueurs d'élution plus ou moins tamponnées et préparées à différents pH, au cours de plusieurs séries d'essais, dont nous ne donnons ici que les plus concluants.

Le moût pourri est agité et laissé au contact de 30 g par litre de charbon activé pendant 30 heures environ, en remettant souvent le liquide en suspension. Le charbon est recueilli par centrifugation et on en fait trois parts égales. On élue chacune d'elles respectivement au moyen de trois solutions différentes ajustées à pH 9 : solution phosphatée, solution ammoniacale et solution sodique.

Nous avons observé par ailleurs que le charbon activé fixe toujours une certaine proportion des sucres du moût et qu'il les abandonne à l'éluat. Une simple concentration des éluats qui peut être pratiquée sous vide, ne peut convenir à l'expérimentation, car les sucres ainsi concentrés modifient la richesse du moût d'expérience. On a donc intérêt à insolubiliser la botryticine des éluats par l'alcool éthylique, qui laisse les sucres solubles. Dans tous nos essais, l'éluat est recueilli par centrifugation et il est floculé par l'alcool à 80 p. 100.

Le floculat de l'éluat phosphaté est le plus abondant ; celui de l'éluat sodique occupe un volume insignifiant. On ajoute ces divers floculats à un même moût sain et on fait fermenter parallèlement au même moût sans addition, qui sert de témoin.

L'inhibition provoquée par le floculat alcoolique de l'éluat phosphaté est de loin la plus considérable. Au sixième jour, par exemple, le retard de la fermentation est de 83 g de sucre. Le nombre des levures en fin de fermentation est diminué de 50 p. 100. Le floculat alcoolique de l'éluat ammoniacal provoque seulement un léger retard, tandis que le floculat de l'éluat sodique n'a pratiquement aucun effet.

Etant donc établi que l'élution doit se faire en milieu phosphaté tamponné, nous avons recherché le pH optimum d'élution. Les résultats exposés dans le tableau XXIII montrent que les floculats alcooliques des différents éluats provoquent des inhibitions variables, mais toujours très nettes. Le tampon phosphaté de pH 9 est le plus efficace : au sixième jour par exemple, la fermentation est retardée en sa présence de 74 g de sucre par rapport au témoin, tandis que l'écart porte sur 20 g seulement pour les floculats des éluats à pH 8 et 8,5. Nous utiliserons donc une solution phosphatée, ajustée à pH 9,0 au pH-mètre après mélange avec le charbon activé.

TABLEAU XXIII

Elution du charbon activé à différents pH

Moût de raisin 180 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air

		6 jours	10 jours	1 mois sucre restant
Moût témoin	Sucre fermenté	118	169	6,2
	Nombre de levures	*42*	*46*	
Botryticine éluée à pH 8,0	Sucre fermenté	97	155	8,3
	Nombre de levures	*23*	*36*	
Botryticine éluée à pH 8,5	Sucre fermenté	96	155	16,0
	Nombre de levures	*22*	*30*	
Botryticine éluée à pH 9,0	Sucre fermenté	44	139	22,1
	Nombre de levures	*16*	*23*	

Par ailleurs, nous avons essayé la précipitation par le sulfate d'ammonium en solution concentrée, suivie d'une dialyse, technique qu'on applique habituellement à la séparation des oxydases (135). Dans ces essais, l'éluat recevait un poids de sulfate d'ammonium correspondant à 0,6 saturation en ce sel à 15°C. Après trois jours de repos en glacière, on centrifugeait. Le dépôt ainsi recueilli, de très faible volume, était redissous dans un petit volume d'eau, et on dialysait contre eau distillée à travers une poche de cellophane pour éliminer les sels d'ammonium. Dans nos divers essais, ce liquide ne présentait plus aucune action inhibitrice. La botryticine ne dialysant pas, comme on le verra plus loin, on peut en con-

clure que le sulfate d'ammonium ne permet pas de précipiter correctement cet antibiotique.

c) **pH optimum d'extraction de la botryticine par le charbon activé.** — Les meilleures conditions d'élution étant connues, nous avons précisé, toutes autres choses égales, l'influence du pH du moût pourri sur l'adsorption de la botryticine par le charbon activé.

Un volume de 1,2 l de moût pourri est partagé, après chauffage, en 6 volumes égaux qui sont portés respectivement aux valeurs suivantes de pH : 1,5-2,5-3,5-4,5-6 et 7. Chacun d'eux est ensuite traité de la même manière : addition de charbon activé, élution, et floculation des éluats dans 80 p. 100 d'alcool. Entre pH 3 et 4,5 le trouble est instantané et la floculation est très rapide ; elle est plus lente aux autres pH.

Ces floculats provenant de 200 cm³ de moût pourri sont ajoutés à 20 cm³ de moût sain. On fait fermenter et on suit la marche de la fermentation. Comme le montre le tableau XXIV, les floculats correspondant à des extractions à pH élevés, supérieurs à pH 5,0, activent plutôt la fermentation à son début. Ceux correspondant à des extractions à pH inférieurs à 3,0, provoquent de légers retards, mais qui ne sont plus apparents au septième jour. Par contre, les floculats à pH 3,5 et 4,5 ont empêché toute fermentation.

TABLEAU XXIV

Adsorption de la botryticine par le charbon activé en fonction du pH

Moût de raisin 215 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

	Sucre fermenté après		
	5 jours	9 jours	30 jours
Témoin	39	108	214
Moût + botryticine adsorbée à pH 1,5	42	105	175
Moût + botryticine adsorbée à pH 2,5	38	99	156
Moût + botryticine adsorbée à pH 3,5	Pas de fermentation		
Moût + botryticine adsorbée à pH 4,5	Pas de fermentation		
Moût + botryticine adsorbée à pH 6,0	52	116	190
Moût + botryticine adsorbée à pH 7,0	52	103	196

C'est donc entre pH 3,0 et 4,5 que la botryticine est extraite le plus complètement du moût pourri par le charbon activé. L'acidité normale du moût pourri est du reste, le plus souvent, comprise entre ces valeurs de pH et dans nos essais précédents, nous pensons être restés dans le champ des pH optima d'extraction.

d) **Purification des préparations de botryticine.** — Les floculats alcooliques des éluats du charbon d'extraction se présentent sous forme d'un précipité blanc colloïdal, contenant des oxydases, car ils provoquent

le brunissement des moûts de raisins sains. Le moût sain traité de la même manière au charbon activé donne un floculat d'aspect identique, moins abondant, dénué d'oxydases, et comme l'ont montré divers essais, pratiquement dépourvu d'effet inhibiteur sur les levures.

Dans un de ces essais, par exemple, on a traité séparément, de la manière déjà indiquée, un volume égal du moût pourri et du même moût gardé sain. Les floculats obtenus sont ajoutés à des flacons contenant 100 cm³ de milieu nutritif minéral, additionné des facteurs de croissance nécessaires et titrant 100 g de sucre par litre. On fait fermenter, comparativement au même milieu n'ayant pas reçu de floculat et constituant le témoin.

La fermentation en présence du floculat provenant de l'extraction du moût sain, marque un très léger retard sur la fermentation témoin, d'environ une vingtaine de grammes de sucre. Par contre, le floculat provenant de l'extraction du moût pourri retarde d'une dizaine de jours le départ de la fermentation. Au quatorzième jour, la fermentation étant pratiquement terminée dans les deux autres cas, 21 g de sucre ont seulement été fermentés ici.

Cet essai nous permet de distinguer la légère inhibition due à certains constituants adsorbables et floculables du moût sain, de l'inhibition due à la botryticine qui est beaucoup plus considérable.

Pour obtenir la purification des préparations de botryticine, nous avons essayé d'utiliser le double traitement à l'alcool et au charbon activé, ou encore une série d'extractions au charbon et d'élutions successives.

e) **Précipitation par l'alcool suivie d'une adsorption sur charbon activé.** — Un litre et demi de moût pourri est amené à 80° d'alcool. Le précipité est dissous dans 750 cm³ d'eau distillée. On stabilise par chauffage 5 minutes à 100°C. Après refroidissement, on centrifuge. Le liquide recueilli reçoit alors 30 g par litre de charbon activé. Après 24 heures de contact, on élue avec un tampon phosphaté à pH 9. L'éluat est ensuite floculé à 80° d'alcool.

Ajouté à 150 cm³ de moût sain titrant 156 g de sucre par litre, le floculat provoque une très nette inhibition de la fermentation. Le retard porte sur une cinquantaine de grammes de sucre pendant la première partie de la fermentation ; le nombre final des levures est diminué de 50 p. 100. Cette inhibition n'est pas aussi importante que celles que nous avions observées avec le floculat alcoolique provenant directement du moût pourri ou encore avec floculat de l'éluat de charbon activé. Le moût sain a reçu cependant le floculat correspondant à un volume de moût pourri dix fois supérieur au sien. Les deux séparations conjuguées à l'alcool et au charbon activé permettent une première purification de

la préparation de botryticine, mais au cours des manipulations nécessitées par ces opérations, une forte partie du pouvoir inhibiteur original est perdue.

f) **Adsorptions sur charbon activé et élutions successives.** — La purification des préparations de botryticine par floculations dans l'alcool et redissolutions successives avaient permis d'obtenir, sinon une substance totalement purifiée, du moins un produit débarrassé d'une partie des surcharges ou impuretés et conservant, certaines précautions prises, la presque totalité de son pouvoir inhibiteur original. Nous avons ici, d'une manière analogue, essayé des extractions successives au charbon activé.

1,8 l de moût pourri est traité au charbon activé. On élue avec 600 cm³ d'une solution phosphatée, qui après centrifugation, est partagée en deux volumes égaux. Le premier est floculé par l'alcool à 80°. Le second est à nouveau traité au charbon ; on élue comme précédemment, et ce deuxième éluat est floculé à 80° d'alcool. En outre, un volume de 900 cm³ de moût pourri est traité par l'alcool.

Les divers floculats ainsi obtenus sont ajoutés à 150 cm³ de moût de raisin, qui reçoivent ainsi un précipité provenant d'un volume de moût pourri 6 fois supérieur. On fait fermenter.

Le floculat alcoolique du moût pourri empêche toute fermentation même après 2 mois de séjour à l'étuve et nouvel ensemencement (tableau XXV). Le floculat du premier éluat du charbon provoque seulement un retard, mais assez important : l'écart par rapport au témoin est d'une quarantaine de grammes de sucre tout au long de la fermentation. Celle-ci laisse 21 g de sucre non fermenté dans le milieu.

L'action inhibitrice du floculat alcoolique du deuxième éluat est pratiquement négligeable ; dès le quatrième jour, la marche de la fermentation est identique à celle du témoin.

Les essais de purification de la botryticine utilisant le charbon activé s'accompagnent donc d'une perte de produit telle qu'il n'est pas possible de cette façon de faire des préparations très concentrées et très actives de cet antibiotique.

Nous citerons encore pour mémoire deux essais de purification de la botryticine utilisant la dialyse et l'adsorption sur le phosphate tricalcique.

g) **Dialyse du moût pourri.** — 500 cm³ de moût pourri sont placés dans une poche de cellophane baignant dans l'eau courante. Après 36 h, il reste encore 2°B de sucre dans le moût. Par phénomène d'osmose, le volume du liquide à l'intérieur de la poche a doublé. On floculе alors le moût dialysé par l'alcool éthylique. Le même volume de moût pourri non

TABLEAU XXV

Adsorptions par le charbon activé et élutions successives

Moût de raisin à 150 g de sucre par litre. Fermentation à l'abri de l'air.

		2 jours	4 jours	11 jours	1 mois sucre restant
Moût témoin	Sucre fermenté	41	86	141	8,3
	Nombre de levures	*26*	*37*	*43*	
Moût + floculat direct	Sucre fermenté	pas de fermentation			
	Nombre de levures				
Moût + floculat après *une* adsorption par le charbon	Sucre fermenté	2	41	98	11
	Nombre de levures	*8*	*22*	*30*	
Moût + floculat après *deux* adsorptions par le charbon	Sucre fermenté	28	83	141	10
	Nombre de levures	*20*	*30*	*42*	

soumis à la dialyse est floculé et on détermine l'activité antilevure des deux floculats, après adjonction à 100 cm³ de moût sain.

Le floculat du moût pourri freine comme d'habitude fortement la fermentation, mais l'inhibition est bien plus considérable en présence du floculat du moût pourri dialysé, puisque la fermentation a été empêchée malgré un réensemencement important au septième jour.

Ce fait a pu être observé à nouveau, au cours de plusieurs essais. Donc la botryticine n'est pas dialysable et doit avoir une structure colloïdale, mais il semblerait que par dialyse, on élimine des substances qui s'opposent habituellement à l'action de l'antibiotique.

h) **Adsorption sur phosphate tricalcique.** — On sait que le phosphate tricalcique est utilisé pour la fixation des oxydases, en particulier de la polyphénoloxydase (136). Nous avons essayé d'adsorber la botryticine sur ce support, en opérant à divers pH.

Un volume de 1,3 l de moût pourri est partagé en 6 volumes égaux, qui sont portés à 6 pH différents : 1,5 — 2,5 — 3,5 — 4,5 — 6 et 7.

Chacun d'eux reçoit 75 cm³ d'une suspension dans l'eau de phosphate tricalcique à 35 g par litre. Après 20 minutes d'attente, on centrifuge. On recueille la partie solide qui est éluée avec 150 cm³ d'un tampon phosphaté de pH 9. Les éluats sont ensuite floculés à 80° d'alcool et on essaie leur activité en les ajoutant à 20 cm³ de moût sain.

Ces floculats n'apportent qu'un très léger retard de la fermentation. L'adsorption par le phosphate tricalcique, quel que soit le pH, ne donne donc pas de résultats satisfaisants et on peut penser que la botryticine n'appartient pas au complexe oxydasique et n'est vraisemblablement pas un ferment.

IV. — Production d'inhibiteurs de la fermentation par diverses souches de moisissures

La production de substances antilevures par le *Botrytis cinerea* est une propriété qu'on peut observer pour des cultures de diverses autres moisissures.

Nous avons cultivé sur moût de raisin de 12° Baumé et sur moût de bière différentes souches de champignons : *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Penicillium urticae, Penicillium notatum, Penicillium chrysogenum, Botrytis albino sclerotia et Botrytis cinerea lini* v. Beyma.

TABLEAU XXVI

Formation d'inhibiteurs des levures par diverses moisissures

Nature de la moisissure		Cultures sur moût de raisin	Cultures sur moût de bière
Aspergillus oryzae	Moût.	Forte inhibition : au 5e j retard de 61 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 36 %.	Pas d'inhibition.
	Extrait de mycélium	Légère accélération.	Très légère accélération.
Penicillium urticae	Moût.	Forte inhibition : au 5e j retard de 69 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 27 %.	Légère inhibition : au 4e j retard de 17 g de sucre sur le témoin. Pas d'effet sur le nombre des levures.
	Extrait de mycélium	Légère accélération.	Aucun effet.
Aspergillus niger	Moût.	Pas d'effet.	Pas d'effet.
	Extrait de mycélium	Pas d'effet.	Pas d'effet.
Penicillium notatum	Moût.	Nette inhibition : au 5e j retard de 38 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 25 %.	Nette inhibition : au 5e j retard de 37 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 34 %.
	Extrait de mycélium	Légère accélération.	Aucun effet.
Penicillium chrysogenum	Moût.		Légère inhibition : au 5e j retard de 30 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 30 %.
	Extrait de mycélium		Très légère accélération.
Botrytis albino sclerotia	Moût.	Forte inhibition : au 5e j retard de 63 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 38 %.	Forte inhibition : 5e j retard de 64 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 36 %.
	Extrait de mycélium	Inhibition : au 5e j retard de 21 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 20 %.	Pas d'inhibition.
Botrytis cinerea lini V. Beyma (1)	Moût.		Légère inhibition : 5e j retard de 30 g de sucre sur le témoin. Population finale diminuée : 34 %.
	Extrait de mycélium		Légère accélération.

(1) Les cultures de *P. chrysogenum* et de *B. cinerea lini*, v. Beyma sont difficiles sur moût de raisin.

Après quinze jours de culture, on sépare le liquide du mycélium. On épuise le mycélium broyé par lavage à l'eau. On stabilise ces liquides par chauffage et on amène à 80° d'alcool. Les divers floculats recueillis sont ajoutés à un milieu nutritif selon la technique habituelle. Le tableau XXVI rassemble les observations faites dans chaque cas. Mis à part le cas de *B. cinerea lini* v. Beyma, les Botrytis sont, de toutes les moisissures, celles qui sécrètent le plus d'inhibiteurs des levures. Ces substances se trouvent à la fois dans le milieu de culture et dans le mycélium. L'action antilevure d'*Aspergillus orysae* n'apparaît que lorsqu'il est cultivé sur moût de raisin et *Aspergillus niger* est absolument sans action. Les mycéliums des divers Penicilliums en sont dépourvus, tandis que leur milieu de culture inhibe plus ou moins les levures.

Nous n'avons pas poursuivi davantage nos recherches dans cette voie, mais il est probable que pourraient être extraits des cultures de certains Penicilliums et Aspergillus des antibiotiques antifongiques, actifs sur les levures, ayant des propriétés semblables à la botryticine.

V. — Conditions de production et d'efficacité de la botryticine

Nos précédentes observations concernant la botryticine s'appliquaient toutes aux cultures de *B. cinerea* sur jus de raisin. Mais le Botrytis peut se développer sur d'autres milieux et souvent avec plus de facilité que sur le moût de raisin qui est trop riche en sucre. La question qui se pose alors est de savoir si la production de substance inhibitrice s'observe quel que soit le milieu. D'autre part, dans nos conditions d'expérience : cultures fixes et ensemencements faibles, le *Botrytis cinerea* se développe lentement à la surface du milieu de culture. Les moûts pourris sont généralement traités en vue de l'extraction de la botryticine au moment où la surface du liquide est entièrement recouverte et où la couleur gris cendré du mycélium indique la formation de conidies. Habituellement, en effet, on sait que la production d'un antibiotique est maximum au moment de la sporulation du champignon. Mais il importe de rechercher s'il en est bien ainsi pour la botryticine. Nous nous attacherons à éclaicir ces deux points et à fixer le moment où la teneur de la culture en botryticine est optimum.

a) **Influence des conditions de pH du milieu de culture.** — Le Botrytis se développe bien sur le moût de raisin à son pH naturel, généralement voisin de 3,5. Dans l'essai suivant, nous cherchons à déterminer si un autre pH ne conviendrait pas mieux à la formation de la botryticine.

On ensemence de spores de Botrytis une série de flacons erlenmeyers contenant le même volume du même moût amené à différents pH par additions d'acide ou de soude : pH 2,8 — 3 — 3,5 — 4,5 et 7. Après trois

semaines de culture, le développement est assez variable et le poids de mycélium frais recueilli est un peu différent pour chacun des milieux. Il est plus élevé aux pH inférieurs à 4,0. Le Botrytis se cultive mieux en milieu acide. Du reste, comme cela a été démontré par CHARPENTIÉ (129), le Botrytis pendant sa croissance, par la combustion des acides qu'il provoque aux pH bas et la formation d'acide citrique qu'il produit aux pH élevés, uniformise en quelque sorte l'acidité ionique de son milieu de culture.

Après culture, nous avons amené chacun de ces liquides à pH 3,5, qui est, on l'a vu, le pH optimum de floculation, et nous l'avons porté à 80° d'alcool. Les floculats obtenus sont essayés sur la fermentation selon la technique habituelle.

Le floculat provenant d'une culture à pH 2,8 ne permet qu'une ébauche de fermentation. Elle ne se manifeste que 10 jours après l'ensemencement et laisse dans le milieu de fortes quantités de sucre non transformées.

Aucune fermentation n'a été possible en présence des floculats des cultures à pH 3,0 et 3,5.

Avec le floculat de la culture à pH 4 l'inhibition observée est moindre : le retard par rapport au témoin au cinquième jour, par exemple, se chiffre à 91 g de sucre. Cependant la fermentation se poursuit jusqu'à complet épuisement du sucre.

Les floculats des cultures à pH 5 et pH 7 ne provoquent qu'un retard très atténué, portant seulement sur une vingtaine de grammes de sucre tout au long de la fermentation.

En définitive, le Botrytis se développant sur moût de raisin donne le maximum de substance inhibitrice à pH 3,0 et pH 3,5. Ce sont précisément les pH naturels du jus de raisin.

b) **Nature et composition du milieu nutritif.** — Nous avons utilisé dans ces essais quatre milieux de base différents : moût de raisin, eau de levure à 20 p. 100, milieu peptoné à 4 g par litre, milieu minéral de RAULIN.

Les milieux à l'eau de levure et à la peptone sont préparés avec 6 variantes, suivant le substrat offert au Botrytis : glucose, lévulose, saccharose à 100 g par litre, amidon à 50 g par litre, acide tartrique à 10 g par litre, acide malique à 20 g par litre. Après 18 jours, les poids de mycélium formés dans chaque condition sont les suivants en g de matière sèche par litre, alors que sur moût de raisin de pH 3,5 on recueille 5,5 g de mycélium.

Substrat	Eau de levure	Milieu peptoné	Milieu de Raulin
Glucose	7	3	9
Lévulose	5,5	3,5	
Saccharose	7	5	
Amidon	8,5	10	
Acide tartrique	9	5,5	
Acide malique	8,5	5,5	

Les liquides de culture sont traités par l'alcool et le pouvoir antibiotique des floculats est essayé sur la fermentation.

Le floculat du moût de raisin a totalement interdit la fermentation. L'inhibition est faible avec les floculats des milieux à l'eau de levure, quel que soit le substrat hydrocarboné. Après un net retard du début de la fermentation, les écarts avec le témoin ont disparu au seizième jour. Les retards provoqués par le floculat des milieux peptonés sont plus importants lorsque le substrat du Botrytis est constitué d'acide malique ou d'acide tartrique ; avec les milieux sucrés l'inhibition est plus faible ; avec l'amidon elle est inexistante. De même, le floculat obtenu à partir du milieu de RAULIN, malgré une bonne récolte de mycélium, n'a provoqué aucun retard significatif.

Le milieu le plus favorable à la formation de botryticine semble donc être un milieu naturel comme le moût de raisin, à son pH. Mais un milieu à base de peptone donne lieu à des productions intéressantes de botryticine, lorsqu'on fait agir le Botrytis sur les acides malique ou tartrique.

c) **Influence de l'âge de la culture.** — Nous avons cultivé plusieurs souches différentes de *Botrytis cinerea*, à l'étuve à 25°C, dans une série de 5 erlenmeyers d'un litre, contenant 300 cm³ de moût de raisin titrant 12° Baumé. Chacune de ces cultures est traitée après des périodes plus ou moins longues de développement : 6, 8, 14, 21 et 36 jours.

Le mycélium est égoutté et pesé. Finement broyé, on le lave à plusieurs reprises avec de l'eau distillée bouillie. De cet extrait, on retire la botryticine par floculation par l'alcool. Par ailleurs, le moût pourri est traité directement. Pour simplifier, nous ne donnons les résultats détaillés que pour la souche isolée de raisins du Sauternais, les conclusions étant les mêmes pour les autres souches.

Le poids des mycéliums recueillis sur les différentes cultures et l'aspect de celles-ci au moment du traitement, sont donnés ci-dessous.

Durée de la culture	Poids du mycélium frais	Aspect du mycélium
6 jours	4,9 g	Surface recouverte d'un mycélium blanc, pas de conidies.
8 jours	7,5 g	Mycélium grisâtre, commence à sporuler.
14 jours	13,2 g	Mycélium gris foncé, présence de conidies.
21 jours	18,3 g	Mycélium gris foncé, présence de conidies.
36 jours	29,5 g	Mycélium gris foncé, présence de conidies.

Le poids du mycélium augmente en fonction du temps. Le moût de culture est suffisamment riche en substances nutritives, notamment en sucres, pour que le champignon puisse continuer à se développer pendant plus d'un mois.

Cet essai s'est donc poursuivi pendant un temps relativement long. Le milieu de fermentation dans lequel sont ajoutés les divers floculats alcooliques est, bien entendu, le même pour l'ensemble de l'expérience.

Afin d'éviter les pertes possibles d'activité inhibitrice des floculats en fonction du temps, ceux-ci ont été essayés dès leur floculation. Aux cinq périodes de culture correspondent cinq séries de fermentation, chacune d'elles comportant son propre témoin. La fermentation de ces cinq témoins s'est déroulée, à peu de chose près, d'une façon identique. La figure 15 représente les courbes de fermentation obtenues.

Après 6 jours de culture, la surface du moût est déjà totalement recouverte d'une mince couche de mycélium blanc. A ce moment, son

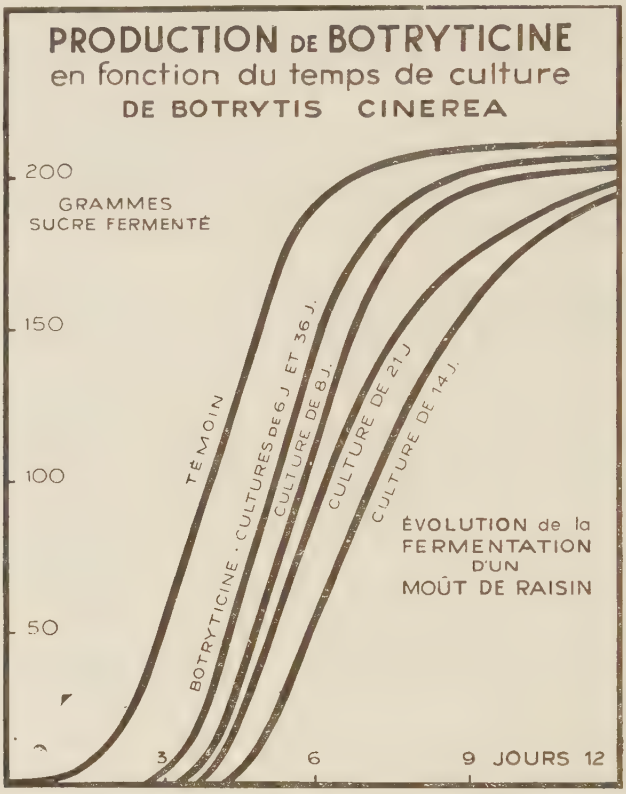


FIG. 15

pouvoir inhibiteur est déjà assez marqué. Le retard provoqué par le floculat de ce moût de culture est, au sixième jour de la fermentation, de 57 g de sucre par rapport au témoin.

Après 8 jours de culture, le botrytis commence à présenter des conidies. Le retard provoqué par la botryticine de cette culture est sensiblement plus important, puisque l'écart avec le témoin est ici de 88 g de sucre, toujours au sixième jour de la fermentation.

La botryticine produite dans la culture de 14 jours, au moment où les conidies donnent au mycélium une couleur cendrée, freine la fermen-

tation de telle sorte que l'écart avec le témoin est de 150 g, comparaison faite toujours au sixième jour après l'ensemencement des levures ; la fermentation commence seulement ici alors qu'elle se termine dans le témoin.

Après 21 jours de culture de Botrytis, l'inhibition provoquée par la botryticine commence à diminuer ; elle se chiffre, toujours dans les mêmes conditions, à 100 g seulement. Enfin après 36 jours, la perte de botryticine s'accentue et le retard n'est plus que de 56 g.

La richesse en antibiotique de la culture de Botrytis croît donc du

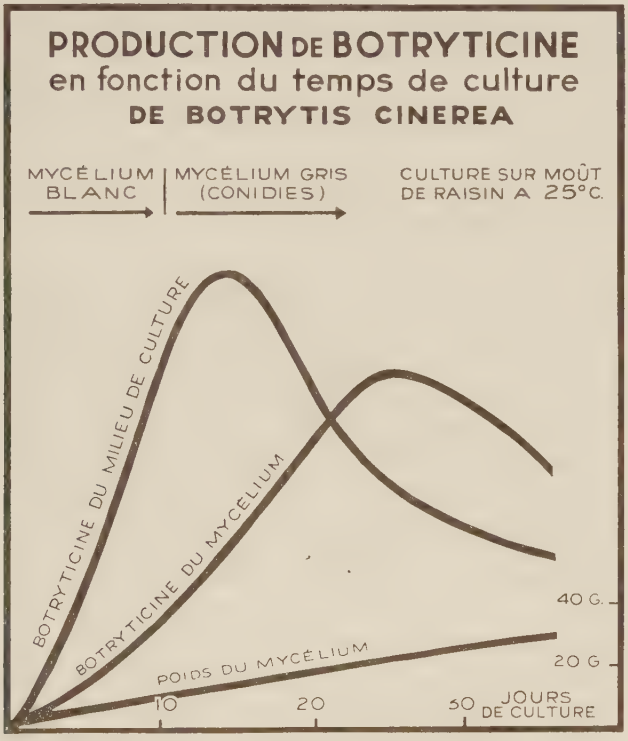


Fig. 16

sixième jour au quatorzième jour, soit jusqu'à la sporulation du champignon, puis décroît ensuite progressivement.

La botryticine des extraits aqueux de mycélium provoque des inhibitions qui se manifestent au sixième jour de la fermentation par un retard de 17 g de sucre, pour la culture de 6 jours, de 29 g pour la culture de 8 jours, de 30 g pour la culture de 14 jours, de 106 g pour la culture de 21 jours, et enfin de 78 g pour la culture de 36 jours. La richesse en antibiotique croît donc lentement dans le mycélium jusqu'à la formation des conidies, puis beaucoup plus rapidement dans les jours suivants, et diminue finalement à partir du 21e jour dans le mycélium vieilli. La

figure 16 qui résulte d'un grand nombre de mesures, reconstitue les courbes de l'évolution de la botryticine dans une culture.

Nous pouvons résumer les observations faites de la façon suivante :

Dans une culture sur moût de raisin, le poids de mycélium augmente linéairement pendant plus d'un mois sans épuiser totalement le milieu et c'est au moment de la pleine sporulation que le moût de culture du Botrytis est le plus riche en botryticine. Ce n'est qu'un peu plus tard que la concentration dans le mycélium atteint son maximum. A ce moment le mycélium se trouve plus riche en botryticine que le liquide de culture. Ces variations du pouvoir inhibiteur en fonction de l'âge de la culture constituent, pensons-nous, une nouvelle preuve de l'existence de cet antibiotique antilevure.

Les mêmes observations peuvent être faites lorsqu'on cultive le *Botrytis cinerea* sur un moût de bière. Cependant sur ce dernier, le développement est plus rapide, et le pouvoir antibiotique apparaît plus vite. Le pouvoir inhibiteur maximum reste cependant du même ordre de grandeur que le précédent.

VI. — Conditions optima d'efficacité de la botryticine

Après avoir précisé dans les paragraphes précédents, les conditions de formation, de purification et de conservation de la botryticine, il nous reste à étudier les variations du pouvoir inhibiteur de cette substance en fonction des variations du milieu de fermentation : conditions de pH, nature des sucres à fermenter, présence des facteurs de croissance en plus ou moins grandes quantités.

a) **Efficacité de la botryticine en fonction du pH des milieux de fermentation.** — On amène à différents pH des volumes égaux d'un même moût de raisin titrant 200 g de sucre par litre : pH 2,6 — 3,0 — 4,0 — 5,0 et 6,0. La moitié de chacun de ces volumes, conservée telle quelle, constituera le milieu de fermentation témoin ; l'autre moitié est additionnée de la quantité de botryticine provenant d'un volume triple de moût pourri. On opère également avec un milieu simple contenant 100 g de glucose par litre.

On constate que le pH influe très peu sur la fermentation du moût, mais qu'il agit nettement sur l'activité de la botryticine. C'est ce que montrent les chiffres ci-dessous, qui expriment en g de sucre par litre, les retards des fermentations au douzième jour.

pH	Fermentation du moût de raisin	Fermentation du milieu simple
2,6	91	15
3,0	77	5
4,0	120	51
5,0	134	24
6,0	150	40

La botryticine a donc une action nettement plus forte lorsque le pH est plus élevé, et ceci s'observe aussi bien lorsque le liquide de fermentation est un moût naturel ou un milieu simple. En définitive, la botryticine, qui se forme surtout dans les milieux de culture de pH bas, et s'extrait de même en milieu acide, agit plus fortement sur les levures à un pH un peu élevé.

b) **Influence de la botryticine suivant la nature du sucre fermenté.** — Jusqu'ici, l'action de la botryticine n'a été étudiée que dans la fermentation d'un mélange de glucose et de lévulose. Nous avons voulu voir si l'inhibition était la même en présence d'autres sucres. Nous avons opéré en milieu simple contenant 100 g par litre de l'un des sucres suivants : glucose, lévulose, mannose, galactose, maltose, saccharose, raffinose. 50 cm^3 de chacun de ces milieux reçoivent la botryticine séparée par l'alcool provenant de 150 cm^3 de moût pourri et on fait fermenter.

On observe de fortes inhibitions quelle que soit la nature du sucre. Les milieux au galactose et surtout au raffinose fermentent lentement et leur retard est encore accentué par addition de botryticine. Glucose, lévulose, mannose, maltose fermentent sensiblement à la même vitesse, mais comparativement, les inhibitions obtenues semblent plus fortes en présence de mannose et de maltose. Le saccharose fermente rapidement et la botryticine provoque en présence de ce sucre un retard très appréciable.

Voici quels sont au onzième jour les retards de fermentation. On les exprime par la différence des poids de sucre fermenté entre le témoin et les milieux additionnés de botryticine : raffinose 18 g ; glucose 38 g ; galactose 42 g ; lévulose 44 g ; saccharose 53 g ; mannose 61 g et maltose 83 g.

La botryticine exerce donc toujours un effet inhibiteur sur les levures quels que soient les sucres fermentés, mais l'importance du retard constaté varie cependant avec la nature de ces sucres.

c) **Efficacité de la botryticine en présence des facteurs de croissance.** — Afin de savoir si la botryticine agissait comme une antivitamine, l'essai suivant a été effectué. On ajoute à des volumes identiques de moût titrant 200 g de sucre par litre, respectivement un excès de l'un des sept facteurs de croissance suivants, aux doses ci-après : 1 mg par litre de thiamine, d'acide p. aminobenzoïque, d'acide nicotinique, d'acide pantothénique, de pyridoxine, 100 γ par litre de biotine, 20 mg par litre de mésoinositol.

La moitié du volume de chacun de ces milieux est gardée comme témoin ; l'autre moitié est additionnée d'une quantité de botryticine provenant d'un volume triple de moût pourri.

On opère de même avec un milieu minéral simple à 100 g par litre de saccharose, contenant déjà les 7 vitamines aux doses ci-après : 0,2 mg par litre de thiamine, d'acide p.aminobenzoïque, d'acide nicotinique, d'acide pantothénique, de pyridoxine, 20 γ par litre de biotine et 10 mg de mésoinositol.

On ensemence et on fait fermenter.

Les moûts sans botryticine fermentent rapidement, avec la même vitesse. Mais la fermentation est complètement empêchée par la botryticine même en présence d'un excès de thiamine, de mésoinositol, d'acide p.aminobenzoïque ou de pyridoxine. Cependant un excès d'acide nicotinique, d'acide pantothénique ou de biotine permet une légère fermentation, qui reste très incomplète.

En étudiant les besoins vitaminiques de la levure n° 51, nous avons pu voir que seuls la biotine et l'acide pantothénique sont nécessaires à sa bonne croissance dans un milieu synthétique contenant déjà toutes les autres vitamines. Dans ce moût déjà riche cependant en facteurs de croissance, ces vitamines en excès permettent à la levure de lutter, dans une faible mesure, contre l'effet inhibiteur de la botryticine.

Dans le milieu simple, l'addition de botryticine n'a pas été suffisante pour inhiber complètement la fermentation ; elle a été simplement retardée. L'écart avec les témoins est faible. Il n'est que de 10 à 20 g de sucre au quinzième jour ; il est presque inexistant à ce moment en présence d'un excès de mésoinositol, après avoir atteint 39 g au septième jour. En définitive, si l'addition d'un excès de certains facteurs de croissance semble activer la fermentation proportionnellement davantage en présence de botryticine, il ne semble pas qu'on puisse parler d'une action antivitaminique vraie de cet antibiotique.

d) **Conclusions.** — Les moûts provenant de raisins attaqués par le *Botrytis cinerea* ou ayant servi de milieu de culture à ce champignon, fermentent toujours très lentement. Le simple épuisement en substances nutritives pour la levure n'explique pas complètement cette fermentation lente, et il a pu être démontré qu'il y a dans de tels moûts et dans le mycélium de Botrytis, une ou plusieurs substances inhibitrices sensibles à l'anhydride sulfureux et détruites par un chauffage prolongé. Ces substances antibiotiques actives sur les levures ont été appelées « botryticine ».

L'extraction de la botryticine d'un moût de raisin s'opère soit par floculation directe du moût pourri à 80° d'alcool, soit par adsorption sur charbon, suivie d'une élution à pH 9 par un tampon phosphaté et d'une floculation de l'éluat par l'alcool. Dans le premier cas, le floculat obtenu contient deux sortes de substances inhibitrices de la fermentation alcoolique. L'une d'elles se trouve déjà dans le moût de raisin sain,

l'autre est caractéristique du moût pourri et constitue la botryticine.

De nombreuses expériences ont été réalisées dans le but de séparer ces deux substances. L'adsorption par le charbon, si elle ne permet pas de conserver tout le pouvoir inhibiteur initial, aboutit cependant dès la première opération à une séparation dans laquelle la botryticine est nettement concentrée. C'est donc sous la forme de floculat alcoolique provenant de l'extraction par le charbon activé que nous avons poursuivi l'étude de la botryticine.

Dans une série d'essais, nous avons pu établir que le milieu le plus favorable à la formation de botryticine par le *Botrytis cinerea* est le moût de raisin à son pH naturel. Dans nos conditions d'expérience : culture non agitée, ensemencement faible, température de culture 25°C, la concentration en botryticine est maximum dans le moût de raisin servant de culture au moment où apparaissent les conidies. Par la suite, les quantités de botryticine diminuent rapidement dans la culture, à la fois sans doute par moindre production et par destruction de la substance préexistante.

Un pH de fermentation élevé favorise l'effet inhibiteur de la botryticine. Certains facteurs de croissance à fortes doses seraient susceptibles de diminuer son action, sans qu'on puisse invoquer cependant une action antivitaminique de la botryticine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous ne reproduirons pas ici simplement les conclusions partielles que nous avons données à la fin de chaque chapitre et nous n'énumérerons pas une fois de plus, les faits d'ordre théorique et pratique que nous avons relevés tout au long de ce travail. Nous voulons seulement tirer les enseignements généraux de notre étude.

Nous avons recherché systématiquement les produits susceptibles d'agir comme activeurs ou, au contraire, comme inhibiteurs de la fermentation alcoolique. Depuis les travaux de PASTEUR, on peut dire schématiquement que les pratiques de la vinification reposent sur l'emploi de techniques activant et régularisant les fermentations, en réalisant les conditions les plus favorables au développement des levures, tandis que les pratiques de la conservation des vins tendent, par contre, à empêcher tout développement microbien, en créant des conditions défavorables à la multiplication des levures et des bactéries. La conservation des vins sucrés notamment est assurée par l'emploi d'un antiseptique, l'anhydride sulfureux.

Il est évident que pour utiliser au mieux les levures, il faudrait être en mesure, pour ainsi dire à volonté, d'accélérer leur travail et inversement de le freiner ou de l'empêcher complètement. Cette considération a été le point de départ de notre étude.

Il nous semble qu'une notion primordiale qui éclaire d'un jour nouveau les problèmes pratiques que posent les fermentations, découle de nos travaux : il existe dans le raisin mûr et dans son moût, côte à côte, d'une part des substances qui sont indispensables à la multiplication des levures, et certaines qui en augmentent fortement le rendement de travail, et d'autre part des substances qui freinent leur croissance, jusqu'à l'interdire complètement. Le raisin pourri, attaqué par le *Botrytis cinerea*, est particulièrement riche en substances appartenant à ces deux catégories qui sont d'ailleurs différentes de celles que présente le raisin sain. Ces observations donnent l'explication de certains aspects encore étranges du phénomène fermentatif, concernant la vitesse de son déroulement dans la pratique. Suivant les concentrations respectives de ces activeurs et inhibiteurs naturels, tantôt la fermentation du moût est rapide et la refermentation du vin facile, tantôt la fermentation est lente, pénible, incomplète et le vin obtenu est relativement stable vis-à-vis des accidents de refermentation.

Si nous ne connaissons pas encore toujours la nature de ces substances, ni les conditions exactes pour lesquelles les activeurs prennent le pas sur

les inhibiteurs, et inversement, on peut cependant espérer de cette notion beaucoup de progrès dans le domaine pratique. Obtenir à coup sûr la fermentation complète dans les délais souhaitables, d'un autre côté obtenir des vins biologiquement stabilisés, que ce soit du reste vis-à-vis des levures de refermentation ou des bactéries de maladies, on peut envisager que les solutions de ces deux problèmes seront un jour réalisables, sans le secours d'aucune addition artificielle. Il mérite d'être souligné que la nature nous donne, dans le raisin même, les moyens de réaliser parfaitement sa transformation en un produit biologiquement stable.

Sans attendre la connaissance complète de ces produits du raisin, biocatalyseurs et bioinhibiteurs, étude qui pose des problèmes difficiles de chimie organique, nous avons déjà à notre disposition des substances similaires qui ne proviennent pas du raisin, mais douées de propriétés semblables. L'activeur que synthétise l'*Aspergillus niger* est du même type que celui que produit le *Botrytis cinerea* dans les raisins pourris, et il est probablement voisin des facteurs d'activation qui existent naturellement dans le raisin sain.

Par ailleurs si la botryticine des raisins pourris noble et les substances qu'on peut séparer des jus de raisins sains par simple floculation alcoolique, sont certainement chimiquement très différentes de l'actidione de *Streptomyces griseus*, ces trois substances naturelles présentent des propriétés antilevures communes, plus ou moins intenses, mais toujours réelles.

En outre des observations d'antagonisme levures-bactéries, constatées d'abord de cellule à cellule, mais que possèdent encore les milieux de culture filtrés (93), laissent présager qu'il sera peut-être possible de tirer profit de ces faits d'antibiose pour préserver les vins des maladies microbiennes.

Enfin, du chapitre qui traite des besoins en facteurs de croissance des levures de vin, se dégagent encore des notions essentielles pour la solution de ces mêmes problèmes pratiques. La succession et la coopération dans la fermentation du moût des différents genres et espèces de levures qui font le vin, les possibilités de refermentation, la sensibilité aux maladies, sont probablement pour une grande part sous la dépendance des teneurs du raisin et du vin en facteurs de croissance. Certaines carences peuvent conduire à une meilleure stabilité biologique. Mais une documentation sur les teneurs en facteurs de croissance, et la connaissance de leur évolution nous manquent encore pour une interprétation complète.

Ainsi notre travail, en plus des solutions pratiques acquises ou très proches, qu'on trouve au long de cet exposé, donne l'explication de faits techniques jusqu'ici incompréhensibles. S'il ne prétend pas résoudre définitivement tous les problèmes posés, il nous semble du moins que se trouve beaucoup mieux tracée la route à suivre désormais dans ces recherches.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — *Ann. Techn. agric.*, 1953, **4,** 265.
(2) Peynaud (E.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1952, **7,** 71.
(3) Lafourcade (S.). — *Ind. agric. alim.*, 1954, **71,** 15.
(4) Pasteur (L.). — *Etudes sur la bière*, 1876.
(5) Ribéreau-Gayon (J.). — *Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux*, juin 1945.
(6) Laborde (J.). — *Cours d'Œnologie*, Bordeaux, 1907, p. 186.
(7) Gayon (U.). — *Rapport sur la vinification dans les années chaudes.* Bordeaux, 1895. *La vinification dans les pays chauds.* Congrès de Carthage, 1896.
(8) Ribéreau-Gayon (J.), Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — *Ind. agric. alim.*, 1951, **68,** 141.
(9) Hewitt (F. L.). — *Oxydation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry.* Livingstone éd., Edimburg, 1950.
(10) Ehrlich (F.). — *Berichte Deuts. Chem. Gesell.*, 1907, **40,** 1027 ; 1911, 44, 139 ; 1912, 45, 883.
(11) Stickland (L. H.). — *Biochem. Journ.*, 1934, **28,** 1746 ; 1935, **29,** 288 ; 1935, 29, 889.
(12) R. Thorne (S. W.). — *Wallerstein Lab. Com.*, 1946, **9,** 97 ; 1950, **13,** 319.
(13) Barton-Wright (E. C.). — *Wallerstein Lab. Com.*, 1952, **15,** 115.
(14) Smythe (C. V.). — *Enzymologia*, 1939, **6,** 9.
(15) Winzler (R. J.), Burck (D.) et Duvigneau (V.). — *Arch. Biochem.*, 1944, **5,** 25.
(16) Massart (L.) et Heymans (P.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1950, **32,** 879.
(17) Valaize (H.). — *Ind. agric. alim.*, 1949, **66,** 349.
(18) Peynaud (E.). — *Ind. agric. alim.*, 1948, **65,** 99.
— Lafon. (M.) — *Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique.* Thèse Sciences Physiques, Bordeaux, 1954.
(19) Flanzy (M.) et Banos (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1938, **24,** 98.
(20) Van Laer (H.). — *Rev. Ferm. alim.*, 1946, **1,** 207 ; 1948, **3,** 194.
(21) Liebig (J.). — *Ann. Chim. phys.*, 1871, **23,** 5.
(22) Wildiers (H.). — *La cellule*, 1901, **18,** 313.
(23) Eastcott (E. V.). — *Journ. phys. chem.*, 1928, **32,** 1094.
(24) Williams (R. J.) et Roehm. — *Jour. biol. Chem.*, 1930, **87,** 581.
(25) Kögl (E.) et Tönnis (B.). — *Zeits. Physiol. Chem.*, 1936, **242,** 43.
(26) Williams (R. J.), Lyman (C. M.), Goodyear (G. H.), Truesdail (J. H.) et Holaday (D.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1933, **55,** 2912.
(27) Williams (R. J.), Mitchell (H. K.), Weinstock (H. H.) et Snell (E. E.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1940, **62,** 1784.
(28) Schultz (A. S.), Atkin (L.) et Frey (C. N.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1939, **61,** 1931.
(29) Eakin (R. E.) et Williams (R. J.). — *Journ. Amer. Chem. Assoc.*, 1939, **61,** 1932.
(30) Rogosa (M.). — *Journ. of Bacteriology*, 1943, **46,** 436.
(31) Rainbow (C.). — *Nature*, 1948, **162,** 5723.
(32) Cutts (H. S.) et Rainbow (C.). — *Nature*, 1949, **164,** 2345.
(33) Tria (E.) et Barnabei (O.). — *C. R. Congrès Intern. de Biochimie*, 1952, p. 496.
(34) Alexander (B.) et Subbarow (Y.). — *Journ. Biochem. Chem.*, 1940, **135,** 341.
(35) Williams (R. J.), Eakin (R. E.) et Snell (E. E.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1940, **62,** 1204.
(36) Leonian (L. H.) et Lilly (V. G.). — *Amer. Journ. Botany*, 1942, **29,** 459.

(37) Schultz (A.), Atkin (L.) et Frey (C. N.). — *Journ. of Bact.*, 1940, **40,** 334.
(38) Schultz (A.), Atkin (L.) et Frey (C. N.). — *Arch. of Biochem.*, 1947, **14,** 369.
(39) Lochead (A. G.) et Landerkin (G. B.). — *Journ. Bact.*, 1942, **44,** 343.
(40) Burkholder (R. R.). — *Amer. Journ. Botany*, 1943, **36,** 206.
(41) Burkholder (R. R.), McVeigh (I.) et Mayer (D.). — *Journ. Bact.*, 1944, **48,** 385.
(42) Atkin (L.) et Gray (P. P.). — *Bioch. Bioph. Acta*, 1949, **3,** 692.
(43) Moses (W.) et Joslyn (M. A.). — *Journ. of Bact.*, 1953, **66,** 197 ; 1953, **66,** 204.
(44) Rabinowitz (J. C.) et Snell (E. E.). — *Arch. Bioch. Biophys.*, 1951, **33,** 472.
(45) Schopper (W. H.). — *C. R. Soc. phys. hist. nat. Genève*, 1944.
(46) Menzinsky (G.). — *Ark. Kem. Sverige*, 1950, **2,** 1.
(47) White (J.) et Munns (D. J.). — *Amer. Brewer.*, 1953, **86,** 29.
(48) Verona (O.). — *Ann. Facolta agrar. Pisa*, 1951, **12,** 105.
(49) Wiken (T.) et Richard (O.). — *Antonie van Leuwenhoek*, 1951, **17,** 209 ; 1952, **18,** 31. *Schweiz. Zeits. Allg. Patho. Bakt.*, 1951, **14,** 560.
(50) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — *Ann. Techn. agric.*, 1953, **4,** 265.
(51) Genevois (L.) et Flavier (H.). — *P. V. Soc. Sci. Phys. Bordeaux*, 30 mars 1939.
(52) Perlman (L.) et Morgan (A. F.). — *Bull. Intern. Vin*, 1946, **187,** 15.
(53) Castor (J. G. B.). — *Applied. Microb.*, 1953, **1,** 97.
(54) *Jahresbericht*, 1949-1951. Station de Wädenswill, p. 627.
(55) Ribéreau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1952, **39,** 444.
(55 *bis*) Casas (J.). — *Ion*, 1954, nº 152.
(56) Garino-Canina (E.) et Trevisiol (E.). — *X^e Congrès Intern. Ind. agric. alim.*, 1954, Madrid.
(57) Ribéreau-Gayon (J.) et Ribéreau-Gayon (P.). — *Chimie et Industrie*, 1953, **70,** 416 et 694.
(58) Ribéreau-Gayon (J.) et Ribéreau-Gayon (P.). — *VII^e Congrès Intern. Vigne et Vin*, 1953, Rome.
(59) Dupuy (P.) et Flanzy (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1954, **40,** 273.
(60) Nielsen (N.) et Hartelius (V.). — *C. R. Labo. Carlsberg*, 1932, **19,** nº 8.
(61) Nielsen (N.) et Hartelius (V.). — *Ibid.*, 1937, **22,** 1 ; *Zeits. ges. Brauwesen*, 1937, **60,** 109.
(62) Nielsen (N.) et Sing-Fang, Fang. — *C. R. Labo. Carlsberg*, 1937, **22,** 141.
(63) Kiessling (W.). — *Ind. Agric. alim.*, 1949, **66,** 111.
(64) Ribéreau-Gayon (J.), Peynaud (E.) et Lafon (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 757.
(65) Brevets français nºs 878.989, 878.990 et 878.991, 10 février 1943.
(66) Ribéreau-Gayon (J.), Lafourcade (S.) et Lafon (M.). — *Ind. agric. alim.*, 1950, **67,** 477.
(67) Genevois (L.). — *Ann. des ferment.*, 1935, **1,** 86.
(68) Ribéreau-Gayon (J.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1932, **25,** 339.
(69) Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — *Bull. Intern. Vin.*, 1952, **252,** 110.
(70) Wolf (P. A.). — *Food Technology*, 1950, **4,** 294. — Mossel (D. A. A.) et Bruin (A. S. de). — *Journ. Microb. Serol.*, 1950, **16,** 393. — Eeckhaut (R. G.). — *Fermentatio*, 1952, **5,** 123. — Di Caro (S.). — *Annali sperim. agr.*, 1953, **7,** 1651.
(71) Lundsgaard. — *Biochem. Zeits*, 1930, **220,** 8 ; 1932, **250,** 61. — Cayrol et Genevois (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1931, **192,** 1494. — Genevois (L.), Cayrol et Nicolaieff. — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112,** 1382.

(72) Fales (F. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **202,** 157. — Trevelyan (W. E.), Gammon (J. N.), Wiggins (E. H.) et Harrison (J. S.). — *Biochem. J.*, 1952, **50,** 303.
(73) Pilod (M.) et Codvelle (F.). — *Ann. Hyg.*, 1932, **10,** 654. — Kling (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1932, **194,** 1402. — Metalkinoff (N.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **201,** 411.
(74) Delage (J. C.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1923, **16,** 483. — Roos (L.) et Hugues (E.). — *Ibid.*, 1924, **17,** 413. — Moreau (L.) et Vinet (E.). — *Ibid.*, 1924, **17,** 477. — Ferre (L.). — *Ibid.*, 1925, **18,** 34.
(75) Banhidi (Z. G.) et Heuler (H. V.). — *Wallersteins Comm.*, 1952, **15,** 378.
(76) Miller (E. J.) et Harrison (J. S.). — *Nature* (London), 1950, **166,** 1035.
(77) Pratt (R.), Dufrenoy (J.), Sah (P. P. T.), Oneto (J.), Brodie (D. C.), Riegleman (S.) et Pickering (V. L.). — *Journ. Amer. Pharm. Assoc.*, 1950, **39,** 127. — Ribéreau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1952, **39,** 479.
(78) Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **36,** 1924.
(79) Peynaud (E.). — *Soc. de Phytiatrie*, juin 1954.
(80) Kittleson (A. R.). — *Analytical Chem*, 1952, **24,** 1173.
(81) Roubert (J.). — *C. R. Journée Technique Institut agricole d'Algérie*, 1953, p. 75.
(82) Cordonnier (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1954, **40,** 243.
(83) Benedict (R. G.). — *The Bot. Review.*, 1953, **19,** 229.
(84) Lebedeff (A.). — *Ann. Brass. Dist.*, 1900, **3,** 290.
(85) Fernbach (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1909, **142,** 438.
(86) Boulard (M.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1926, **12,** 615.
(87) Malvezin (P.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1927, **41,** 713.
(88) Ferré (L.). — *Ind. agric. alim.*, 1949, **66,** 259.
(89) Ribéreau-Gayon (J.), Lafourcade (S.) et Lafon (M.). — *Ibid.*, 1950, **67,** 477.
(90) Waksman (S. A.). — *Antagonismes microbiens et substances antibiotiques.* Sédès éd., 1948.
(91) Cook, Krehe, Giersch et Schroeder. — *Science*, 1941, **93,** 616.
(92) Seigneurin (R.), Garraz (G.), Roux (A.) et Syndico (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73,** 81.
(93) Koch (R.). — *Brasserie et Malterie* (Belgique), 1953, **3,** 250.
(94) Kopaczewski (W.). — *Archiv. microb.*, 1931, **2,** 187.
(95) Sobels (J. C.). — *Antonie van Leeuwenhock*, 1950, **16,** 123.
(96) Muller-Thurgau (H.). — *Landwirt. Jahrbücher*, 1888, **17.** 83.
(97) Michel (A.). — *Bull. Intern. Vin*, 1946, **185,** 127.
(98) Schanderl (H.). — *Die Mikrobiologie des Weines*, Enger Ulmer éd., Stuttgart, 1951, p. 137.
(99) Alexopoulos (G. J.). — *Ohio Journ. Sci.*, 1941, **41,** 425.
(100) Kasuyoshi Aiso et coll. — *Journ. of Antibiotics* (Japon), 1951, **4,** 357.
(101) Waksman (S. A.), Romano (A. H.), Lechevallier (H.) et Raubitschek (F.). — *I*er *Symposium intern. Chimie microbiol. Genève*, 1952, p. 163.
(102) Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1953, **8,** 228.
(103) Guerillot-Vinet, Guyot (L.), Montaigut (J.) et Roux (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230,** 1424.
(104) Whiffen (A. J.), Bohonos (N.) et Emerson (R. L.). — *Journ. of Bact.*, 1946, **52,** 610.
(105) Brian (P. W.) et coll. — *Journ. gen. Microb.*, 1951, **5,** 619.
(106) Flanzy (M.) et Dupuy (P.). — *Ann. Techn. Agric.*, 1952, **1,** 121.
(107) Dunnshe (B. R.), Leben (C.), Keitt (G. W.) et Strong (F. M.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1949, **71,** 2436.

(108) Hickey (R. J.), Corum (C. J.), Hidy (P. H.), Sohen (L. R.), Nagen (E. B.) et Kropp (E.). — *Antibiotics and chemotherapy*, 1952, **12,** 47.
(109) Lechevalier (H.), Acker (R. P.), Corke (E. T.), Haensler (C. M.) et Waksman (S. A.). — *Mycologia*, 1953, **45,** 155.
(110) Gottlieb (D.). — *Phytopathology*, 1950, **41,** 393.
(111) Swart (L. A.), Romano (A. H.) et Waksman (S. A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1950, **73,** 376.
(112) Hazen (E. L.) et Brown (L.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1951, **76,** 93.
(113) Brian (P. W.). — *Nature* (London), 1944, **154,** 667.
(114) Brian (P. W.), Curtis (P. J.) et Hemming (H. G.). — *Proc. Roy. Soc.* (Londres), 1947, **135,** 106.
(115) Brian (P. W.). — *Ann. Bot.*, 1949, **49,** 59.
(116) Meada (K.) et coll. — *Journ. of antibiotics* (Japon), 1952, **5,** 405.
(117) Walton (R. N.) et Woodruff (H. B.). — *Journ. clin. Invest.*, 1949, **28,** 924.
(118) Lack (A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, **72,** 656.
(119) Davisson (J. W.), Tanner (J. R.), Finlay (F. W.) et Solonious (I. A.). — *Antibiotics and chemotherapy*, 1951, **1,** 289.
(120) Hosoya (S.), Komatsu (N.) et Soeda (M.). — *Journ. of Antibiotics* (Japon), 1952, **5,** 453.
(121) Freeman (G. G.) et Morrisson (R. L.). — *Biochem. Journ.*, 1949, **44,** 1.
(122) Brian (P. W.), Curtis (P. J.), Hemming (H. G.), Unwin (C. H.) et Wright (J. M.). — *Nature* (London), 1949, **164,** 534.
(123) Ford (J. H.) et Leach (B. E.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1948, **70,** 1223.
(124) Kornfeld (E. C.), Jones (R. G.) et Parke (J. V.). — *Ibid.*, 1949, **71,** 150.
(125) Whiffen (A. J.). — *Journ. of Bact.*, 1948, **56,** 283.
(126) Peynaud (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235,** 1163.
(127) Schneider (H. G.), Tener (G. M.) et Strong (F. M.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1953, **75,** 1100.
(128) Kielhofer (E.). — *Wein und Rebe*, 1953, **35,** 638.
(129) Charpentié (Y.). — *Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins.* Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux, 1954. — *Ann. de Technologie*, 1954.
(130) Laborde (J.). — *Rev. Vitic.*, 1897, **7,** 524.
(131) Moreau (L.). — *Rev. Vitic.*, 1902, **26,** 229.
(132) Laborde (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1896, **123,** 1074 ; 1898, **126,** 536.
(133) Peynaud (E.) et Charpentié (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1953, **46,** 14.
(134) Bastin (R.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1954, **9,** 15.
(135) Bertrand (D.). — *VIII^e Congrès de Chimie biologique*, 1948, p. 185 et 191.
(136) Sarkar (N. K.) et Sumner (J. B.). — *Enzymologia*, 1951, **14,** 280.
(137) Euler (von) et Swartz. — *Zeits. Physiol. Chemie.*, 1924, **140,** 146.
(138) Kögl et Borg. — *Zeits. Physiol. Chemie*, 1941, **269,** 97.
(139) Brisou (J.) et Genevois (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107,** 865.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

MILIEUX, MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

I. — **Milieux de fermentation** 13
II. — **Levures utilisées** 14
III. — **Température d'incubation** 15
IV. — **Conditions d'aération** 15
V. — **Détermination de l'évolution de la fermentation** 16
a) Dosage des sucres réducteurs 16
b) Pesées du gaz carbonique dégagé 16
VI. — **Mesure de la croissance des levures** 17
a) Numération des cellules totales à l'hématimètre 17
b) Numération des cellules vivantes sur milieu nutritif solide 18

PREMIÈRE PARTIE

ACTIVEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'AÉRATION

I. — **Influence de l'aération en cours de fermentation** 22
II. — **Variations du potentiel d'oxydo-réduction en cours de fermentation** 24
III. — **Influence du degré alcoolique** 26
IV. — **Conclusions** 27

CHAPITRE III

NUTRITION AZOTÉE DES LEVURES

I. — **Enrichissement du moût en azote ammoniacal** 29
II. — **Mode d'action de l'azote ammoniacal** 31

III. — **Enrichissement du moût en azote aminé** 32
IV. — **Assimilation azotée en présence d'éthanal et d'acide pyruvique** 32
V. — **Conclusions** 35

CHAPITRE IV

FACTEURS DE CROISSANCE DES LEVURES

I. — **Besoins en facteurs de croissance des levures de vin cultivées en milieu synthétique** 44
II. — **Influence de l'enrichissement du moût de raisin en facteurs de croissance** 48
a) Efficacité de la thiamine 48
b) Mode d'action de la thiamine 49
III. — **Conclusions** 51

CHAPITRE V

ACTIVEURS DE LA FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

I. — **Action de l'activeur d'Aspergillus niger sur la fermentation alcoolique** 53
II. — **Présence de l'activeur de Nielsen dans les myceliums de Botrytis et de Penicilliums** 58
III. — **Conclusions** 60

Deuxième partie

INHIBITEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

CHAPITRE VI

ACTION DES ANTISEPTIQUES SUR LES LEVURES

I. — **L'anhydride sulfureux** 65
a) Influence du sulfitage du moût sur la formation d'éthanal.
b) Conditions du mutage.
II. — **Limites d'efficacité de certaines substances antiseptiques** .. 68
III. — **Essai des sulfamides sur les levures** 69

IV. — **Essai des sels d'ammonium quaternaire** 70
a) Expérimentation des sels d'ammonium quaternaire sur la fermentation 70
b) Mode d'action des sels d'ammonium quaternaire 73
V. — **Découverte de produits très actifs sur les levures parmi les antifongiques de synthèse** 73
VI. — **Conclusions** 75

CHAPITRE VII

ACTION DES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES SUR LES LEVURES

I. — **Isoantagonisme** 76
II. — **Antagonisme levures — bactéries et levures — champignons** 78
III. — **Nicroorganismes producteurs de substances antifongiques et antilevures.** 79
IV. — **Action des antibiotiques des premier et deuxième groupes.** 80
V. — **Action des antibiotiques du troisième groupe** 81
VI. — **Conclusions** 86

CHAPITRE VIII

FORMATION PAR BOTRYTIS CINEREA D'UN ANTIBIOTIQUE AGISSANT SUR LES LEVURES

I. — **Essais de fermentation des moûts botrytisés** 87
a) Enrichissement des moûts botrytisés en certains éléments 88
b) Action des diverses sécrétions fongiques 90
c) Action de l'anhydride sulfureux 92
II. — **Essais de séparation et de purification de la botryticine** 94
a) Extraction par solvants 94
b) Précipitation par l'alcool éthylique 94
c) Solubilité de la botryticine dans le moût 96
d) Degré alcoolique optimum de floculation de la botryticine 96
e) Précipitations successives par l'alcool des substances inhibitrices 98
f) Conservation des préparations alcooliques de botryticine 98
g) Action de divers facteurs sur les fermentations en présence de botryticine 101

III. — **Extraction de la botryticine par le charbon activé** 103
a) Adsorption de la botryticine des moûts pourris sur charbon activé 103
b) Elution du charbon activé 104
c) pH optimum d'extraction de la botryticine par le charbon activé 106
d) Purification des préparations de botryticine 106
e) Précipitation par l'alcool suivie d'une adsorption sur charbon activé 107
f) Adsorptions sur charbon activé et élutions successives
g) Dialyse du moût pourri 108
h) Adsorption sur phosphate tricalcique 109

IV. — **Production d'inhibiteurs de la fermentation par diverses souches de moisissures** 110

V. — **Conditions de production de la botryticine** 110
a) Influence des conditions de pH du milieu de culture .. 111
b) Nature et composition du milieu nutritif 112
c) Influence de l'âge de la culture 113

VI. — **Conditions optima d'efficacité de la botryticine.** 116
a) Efficacité de la botryticine en fonction du pH des milieux de fermentation 116
b) Efficacité de la botryticine suivant la nature du sucre fermenté 117
c) Efficacité de la botryticine en présence des facteurs de croissance 117
d) Conclusions 118

Conclusions générales 119

Bibliographie 122

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 16-12-1954.
Dépôt légal: 3e trimestre 1954 *N° d'impression: 530*

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

DONNÉES GÉNÉRALES SUR LES CONSTITUANTS DE LA CELLULE VÉGÉTALE ET DE LA CELLULE DE LEVURE EN PARTICULIER

VU ET APPROUVÉ :

Bordeaux, le 5 juillet 1954.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. BRUS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 7 juillet 1954.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

E. DELAGE.